

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ANÁLISE IMUNOGÊNICA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE
ASPARTIL AMINOPEPTIDASE (Rv0800) DE *Mycobacterium
tuberculosis***

Duane Alves da Silva

Orientadora: Ana Paula Junqueira Kipnis

GOIÂNIA

2014



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFV

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFV a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFV, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Duanne Alves da Silva** E-mail: **duanne.vet@gmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não

Vínculo Empregatício do autor: **Bolsista** Agência de fomento: CAPES

País: **Brasil** UF: **Goiás** CNPJ: **00889834/0001-08** Sigla: **GO**

Título: **ANÁLISE IMUNOGÊNICA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ASPARTIL AMINOPEPTIDASE (Rv0800) DE Mycobacterium tuberculosis** Palavras-chave: **tuberculose, protease, bacilo de Koch, imunogenicidade, vacina, adjuvante**

Título em outra língua: **Immunogenic analysis of the recombinant protein aspartil aminopeptidase (Rv0800) from Mycobacterium tuberculosis**

Palavras-chave em outra língua: **tuberculosis, protease, Koch bacillus, immunogenicity, vaccine, adjuvant**

Área de concentração: **Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **05/12/2014**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

Orientador(a): **Ana Paula Junqueira Kipnis** E-mail: **apkipnis@gmail.com**

Co-orientador(1): **André Kipnis** E-mail: **akipnis@ufv.br**

Co-orientador(2): **Liliana Borges de Menezes Leite** E-mail: **lbm03@hotmail.com**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

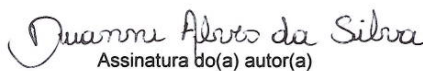
[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 24 de agosto de 2015


Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

DUANNE ALVES DA SILVA

**ANÁLISE IMUNOGÊNICA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE
ASPARTIL AMINOPEPTIDASE (Rv0800) DE *Mycobacterium
tuberculosis***

Tese apresentada para obtenção do título
de Doutor junto à Escola de Veterinária e
Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:
Sanidade animal, higiene e tecnologia de alimentos

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Ana Paula Junqueira Kipnis

Comitê de Orientação:
Prof. Dr. André Kipnis
Prof^a. Dr^a. Líliliana Borges de Menezes Leite

GOIÂNIA

2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Alves da Silva, Duanne
ANÁLISE IMUNOGÊNICA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE
ASPARTIL AMINOPEPTIDASE (Rv0800) DE *Mycobacterium*
tuberculosis [manuscrito] / Duanne Alves da Silva. - 2014.
xii, 129 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Ana Paula Junqueira-Kipnis; co-orientador Dr.
André Kipnis; co-orientador Dr. Lílíana Borges de Menezes Leite.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2014.
Bibliografia. Anexos.
Inclui fotografias, gráfico.

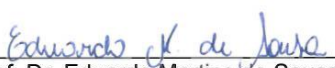
1. Tuberculose. 2. Protease. 3. Bacilo de Koch. 4. Imunogenicidade.
5. Adjuvante. I. Junqueira-Kipnis, Ana Paula, orient. II. Kipnis, André,
co-orient. III. Título.]

DUANNE ALVES DA SILVA

Tese defendida e aprovada em **05/12/2014** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis
(ORIENTADOR (A))



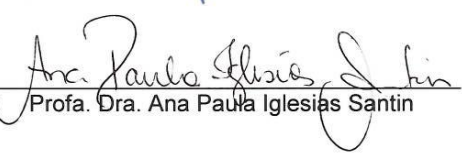
Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa - UniCeuma



Prof. Dr. Walter Martin Roland Oelemann - UFRJ



Prof. Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza – IPTSP/UFG



Profa. Dra. Ana Paula Iglesias Santin

*Dedico este trabalho aos meus amados pais
que mais uma vez suportaram a distância
para verem a concretização de um projeto
que em sua juventude eles não tiveram
a oportunidade de realizar.*

*“Tudo isso eu examinei mediante a sabedoria e disse:
estou decidido a ser sábio; mas isso estava fora
do meu alcance. A realidade está bem distante
e é muito profunda; quem pode descobri-la?
Por isso dediquei-me a aprender, a investigar,
a buscar a sabedoria e a razão de ser das coisas,
para compreender a insensatez da impiedade
e a loucura da insensatez.”*

Eclesiastes 7: 23-25

AGRADECIMENTOS

Agradeço a finalização deste projeto ao meu Deus pai, que me concedeu saúde e vitalidade todos esses anos para suportar a saudade e a distância, e assim me dedicar ao desenvolvimento deste estudo.

Aos meus pais, minha base de sustentação, que mais uma vez me apoiaram, entenderam a minha ausência e torceram mesmo de longe para a realização deste projeto.

À minha orientadora, Dr^a Ana Paula Junqueira-Kipnis, por ter aberto as portas do seu laboratório mesmo não me conhecendo. Por ter contribuído de forma ímpar para a minha formação como docente, pesquisadora e cidadã. Por ter me dado a oportunidade de conviver com um dos grupos mais importantes de estudo em tuberculose do mundo, me dando a chance de trabalhar e de ser treinada durante seis meses na Universidade Estadual do Colorado (CSU). Obrigada pelos ensinamentos diários que adquiri ao observar a sua forma de trabalhar, ensinar, orientar e liderar a sua equipe.

Ao meu comitê de orientação que muito contribuiu para a conclusão deste trabalho, Dr. André Kpinis e Dra. Liliana Bezerra de Menezes Leite. Obrigada pelas correções, sugestões e ajustes feitos ao longo desses anos para que este produto fosse gerado.

Ao Dr. André Correia que gentilmente cedeu a proteína alvo deste trabalho e também o seu tempo para me orientar e ensinar todo o processo de produção da proteína recombinante, e por desenvolver as análises iniciais durante o seu doutorado na UnB. Ao Dr. Jaime Martins Santana por ter autorizado o André Correia, na época seu doutorando, a participar e contribuir de forma crucial com este trabalho.

Ao Dr. Luiz Octávio Franco que gentilmente cedeu o peptídeo Cn-AMP1 para compor uma das formulações vacinais testadas neste estudo, e ao Dr. Osmar Nascimento que intermediou o envio das amostras do peptídeo e contribuiu com as informações necessárias para o projeto.

Ao Dr Nikolai Petrovsky, da Universidade de Flinders (Austrália) por ceder gentilmente o adjuvante ADVAX™ para compor outra formulação vacinal avaliada neste trabalho.

Ao Hospital Araújo Jorge de Goiânia nas pessoas da Dr. Patrícia e da técnica Ana Carolina, por cederem gentilmente o citômetro de fluxo para que as aquisições celulares fossem feitas.

À Dra. Aline Carvalho Batista e ao técnico Erildo pela produção das lâminas histológicas utilizadas neste trabalho. A Dra. Mara Rúbia que auxiliou na análise histopatológica além de contribuir durante a qualificação para o aprimoramento dos resultados deste estudo.

Ao *Mycobacteria Research Laboratory* da CSU, nas pessoas de Dr. Ian M Orme, Dr. Randall Basaraba, Dra. Diane Ordway, Dra. Marcela Henao Tamayo, Dra. Mercedes Gonzalez-Juarrero, Dr. Brendan K. Podell, Jenny Harding, David F. Ackart, Crystal Shanley, Sindy Furney, Natalie Lakey e Andreia S.Hidalgo, por todo o auxílio e dedicação durante os seis meses em que estive fazendo meu doutorado sanduíche nesta renomada instituição.

A todos os colegas dos laboratórios de Imunopatologia das Doenças Infecciosas e Bacteriologia Molecular da UFG, que participaram direta e indiretamente da produção deste projeto. Especialmente a minha amiga Monalisa Trentini, que foi o meu braço direito ao longo desses anos com a qual aprendi e aprendo desde o primeiro dia em que entrei no laboratório. E também aos meus queridos Abadio e Bruna, sem os quais eu não teria suportado todos os dias de angústias e saudades. Vocês três fizeram esses anos se tornarem mais alegres e fáceis de suportar mesmo nos momentos mais críticos. Nossas noites de conversas, gargalhadas, choros e até brigas foram fundamentais para que eu conseguisse finalizar mais essa etapa. Obrigada meus amigos irmãos, amo vocês!

Ao meu melhor amigo e companheiro, Igor Bello, que ao longo desses anos sempre esteve presente, ainda que via internet me apoiando e ajudando nas horas alegres e, principalmente, nos momentos difíceis sempre com palavras sábias de ânimo que não me deixaram desistir.

Ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG e todos os funcionários, especialmente a Valéria, Zezinho, Evani e Gilda. Ao Programa de

Pós Graduação em Ciência Animal da UFG por todo o apoio ao longo desses anos, nas pessoas da Dra. Cíntia Minafra, Gerson e Andreia. A CAPES pelas bolsas concedidas e ao CNPq e FAPEG pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1- INTRODUÇÃO	1
2-REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Epidemiologia da tuberculose	4
2.2. O agente etiológico: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
2.3. Patogenia da tuberculose e resposta imune	8
2.4. Proteínas do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
2.5. BCG e vacinas de subunidade proteica	20
2.6. Adjuvantes utilizados em vacinas contra TB	23
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2- PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DAP E AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E PROTEÇÃO DA VACINA DE SUBUNIDADE PROTEICA DAPC EM MODELO MURINO DE INFECÇÃO	39
2-MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1. Produção da proteína recombinante rDAP	43
2.1.1. Amplificação e clonagem do gene <i>pepC</i>	43
2.1.1.1. Transformação de bactérias com o plasmídeo recombinante pCR 2.1/pepC	46
2.1.1.2. Digestão e purificação da sequência codificadora da enzima e do vetor de expressão pET28a.	47
2.1.1.3. Ligação da sequência codificadora da enzima no vetor pET28a, transformação e expressão da proteína recombinante.	47
2.1.2. Purificação da proteína recombinante rDAP	49
2.1.3. Animais	51
2.1.4. Produção de soro anti-DAP em camundongos	51
2.1.5. Western Blot	52
3. Peptídeo Cn-AMP1	53
4. Análise imunogênica da proteína recombinante	53
4.1. Delineamento experimental	53
4.2. Infecção endovenosa com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	54
4.2.1. Determinação da carga bacteriana.	55
4.3. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	55
4.4. Obtenção das células do baço	56
4.5. Obtenção das células do pulmão	57
4.6. Avaliação celular e de citocinas do baço e pulmão	57
4.7. Histopatológico	58
4.8. Imuno-histoquímica associada à coloração álcool-ácido	58

4.9. Análise estatística	60
5-RESULTADOS	61
5.1. Produção da proteína recombinante rDAP	61
5.1.1. Confirmação da amplificação do gene <i>pepC</i> da proteína aspartil aminopeptidase (DAP) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	61
5.1.2. Expressão e purificação da proteína recombinante.	61
5.1.3. Purificação da proteína recombinante rDAP	63
5.1.4. Confirmação da produção da protease pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	64
5.4. Análise da imunogenicidade da proteína recombinante rDAP	65
5.4.1. Resposta imune humoral.....	65
5.4.2. Resposta imune celular	66
5.5. Resposta imune induzida pela vacinação e desafio com Mtb	70
5.5.1. Resposta imune humoral após o desafio	70
5.5.2. Resposta imune celular após o desafio.....	71
5.6. Análise histopatológica.....	74
5.7. Análise imuno-histoquímica e pesquisa de BAAR.....	77
5.8. Capacidade protetora da vacina.....	81
6. DISCUSSÃO	83
7. CONCLUSÃO.....	90
CAPÍTULO 3- AVALIAÇÃO DO ADJUVANTE ADVAX EM ASSOCIAÇÃO COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE DAP NO MODELO MURINO DE INFECÇÃO.	95
1. INTRODUÇÃO	97
2. MATERIAL E MÉTODOS	99
2.1. Proteína rDAP	99
2.2. Adjuvante ADVAX	99
2.3. Desenho experimental.....	99
2.4. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	101
2.5. Infecção endovenosa com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	101
2.5.1. Determinação da carga bacteriana.	102
2.6. Histopatológico	102
2.7. Análise estatística	103
3. RESULTADOS	104
3.1. Resposta imune humoral induzida pelas formulações vacinais contendo o adjuvante ADVAX, antes e depois do desafio.	104
3.2. Análise histopatológica após o desafio.....	105
3.3. Capacidade protetora das vacinas	108
4. DISCUSSÃO	110
5. CONCLUSÃO.....	113
REFERÊNCIAS.....	114
CAPÍTULO 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
ANEXO 1- PARECER DA CEUA UFG	119

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade da enzima Rv0800 (DAP) do *Mycobacterium tuberculosis* como componente de vacina de subunidade proteica em dois sistemas de adjuvantes derivados de plantas. Para tanto, foi feita a produção heteróloga da enzima Rv0800 em *E. coli* e sua expressão pelo Mtb foi confirmada. A proteína recombinante obtida (rDAP) foi avaliada como vacina primeiramente associada ao Cn-AMP1, um peptídeo antimicrobiano proveniente da água de coco, e em outro experimento, associada ao ADVAX™, um adjuvante polissacarídico derivado da delta inulina e foram usadas para vacinar camundongos BALB/c. As vacinas DAPC e DAPVAX induziram anticorpos IgG1 e IgG2a específicos. A vacina DAPC gerou resposta imune celular de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ produtores de IFN- γ ⁺ antes e depois do desafio com Mtb, e quando combinada com a vacina BCG melhorou a resposta induzida por esta. Contudo, apesar de as vacinas terem induzido resposta imune específica no modelo estudado, após a infecção foram geradas extensas lesões pulmonares e não houve diminuição da carga bacilar nos pulmões. Neste projeto foram desenvolvidas novas vacinas de subunidade proteica compostas por uma enzima do *Mycobacterium tuberculosis* associada a adjuvantes derivados de plantas, nunca testados no modelo murino de infecção e que se mostraram imunogênicas, mas não conferiram proteção.

Palavras-chave: tuberculose, protease, bacilo de Koch, imunogenicidade, vacina, adjuvante

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

1- INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é um grande problema mundial de saúde para humanos e animais, podendo ser causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) ou pelo *Mycobacterium bovis*. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2013 confirmaram que, em um período de um ano, mais de 9 milhões de pessoas desenvolvem a doença em todo o mundo, com uma estimativa de 1,5 milhões de mortes. Outro agravamento que piora o cenário da tuberculose no mundo é a ocorrência da coinfeção com o HIV, além do surgimento de novas cepas de Mtb resistentes aos principais antibióticos utilizados no tratamento da doença (WHO, 2014).

A doença é classificada como uma zoonose, afetando o homem, bovinos, pequenos ruminantes e, em alguns países, animais selvagens (como texugo, por exemplo). Apesar de o principal agente causador da TB em seres humanos ser o *Mycobacterium tuberculosis*, o *Mycobacterium bovis* também pode infectar o homem e gerar a doença. Já os bovinos se infectam apenas pelo *M. bovis*, desenvolvendo a tuberculose bovina (TBb), tornando-se potentes transmissores da doença para o homem. Estima-se que 50 milhões de bovinos estejam infectados pelo *M. bovis* em todo o mundo. Mesmo com a eliminação dos animais positivos no teste da tuberculina, essa medida não é bem sucedida em alguns países que apresentam reservatórios selvagens do *M. bovis*, além de não ser acessível ou aceita em outros países. Logo, tanto para seres humanos, como para os animais, existe uma necessidade urgente de desenvolvimento de terapias capazes de controlar a infecção por micobactérias (BUDDLE et al., 2013).

Está claro que as infecções causadas por microrganismos do gênero *Mycobacterium* afetam a vida de milhões em todo o mundo. Esforços na tentativa de combater a TB têm sido confrontados com uma variedade de obstáculos e a ineficácia da vacina BCG na prevenção da doença é o principal deles (WHO, 2009). Apesar de a BCG ser amplamente utilizada em todo o mundo em crianças recém-nascidas, se caracterizando como a vacina mais segura até hoje, sua eficácia é muito variável, protegendo apenas contra as formas graves da TB na

primeira infância. Já em adolescentes e adultos essa proteção é incompleta ou inconsistente (OTTENHOFF & KAUFMANN, 2012).

Nos animais esse cenário não é diferente. Como nos humanos, a capacidade protetora da BCG é muito variável (0-80%) e mesmo nos testes em que bovinos receberam mais de uma dose da vacina, não houve desenvolvimento de proteção considerável (BUDDLE et al., 2003; WEDLOCK et al., 2003). Devido ao elevado risco para a saúde humana, a TBb está na lista das enfermidades de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Assim como a TB, a tuberculose bovina está difundida em todo o mundo e prejudica o desenvolvimento da bovinocultura, tanto nos ramos de laticínios como de produtos cárneos, interferindo diretamente no comércio internacional dessas mercadorias, o que reflete diretamente na economia de países como o Brasil, que tem a agropecuária como uma das bases de seus recursos econômicos. Além disso, custos com testes diagnósticos e descarte de animais positivos, já que não existe tratamento ou uma vacina protetora para os bovinos, perda de acordos comerciais, restrição no trânsito de animais e a manutenção de programas de controle e erradicação da doença, geram perdas significativas para a pecuária mundial (RIZZI et al., 2012; WATERS et al., 2012).

A comunidade científica se esforça ao longo de décadas buscando novas formas de combate e erradicação da tuberculose humana e animal, sejam métodos de profilaxia ou tratamento. Nos últimos 15 anos os recursos para o desenvolvimento de terapias contra a TB aumentaram consideravelmente, o que proporcionou progressos importantes no desenvolvimento de novas vacinas que já se encontram em fase de testes clínicos. Os testes em humanos têm como objetivo entender o porquê de a eficácia da BCG ser tão variável, as alterações na administração da BCG bem como a avaliação de candidatos a novas vacinas que melhorem a resposta da BCG ou mesmo que possam substituí-la (ROWLAND & McSHANE, 2011; OTTENHOFF & KAUFMANN, 2012). Paralelamente, os estudos em bovinos também progrediram e, desde 2003, existem vacinas sendo testadas nestes animais (SKINNER et al., 2003 e 2005; MAUE et al., 2007; WATERS et al., 2009; WEDLOCK et al., 2011).

Diante do exposto fica claro que os estudos que visam o desenvolvimento de novas vacinas para a tuberculose nos diversos modelos

animais disponíveis são de extrema relevância. Neste trabalho objetivou-se avaliar a capacidade imunogênica e protetora de novas vacinas de subunidade proteica compostas por uma protease de Mtb associada a dois adjuvantes diferentes provenientes de plantas no modelo de tuberculose murina.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Epidemiologia da tuberculose

No ano de 2014, a OMS lançou novos dados referentes à epidemiologia da TB até o ano de 2013. De acordo com a instituição, nas últimas duas décadas houve progressos na redução do número de casos e de mortes pela doença. O alvo do milênio para o ano de 2015 de deter e reverter a incidência da TB já foi alcançado, com as taxas chegando a 2,2% nos anos de 2010 e 2011. Mundialmente a mortalidade pela tuberculose reduziu em 41% desde 1990, e está a caminho da meta dos 50% de redução até 2015. As taxas de incidência e mortalidade estão em queda na maioria dos países que contribuem com os 80% de casos de TB no mundo, grupo este que o Brasil faz parte (WHO, 2014).

É importante ressaltar que as metas traçadas pela OMS para o ano de 2015 já foram alcançadas pelo Brasil em 2013, que conseguiu reduzir pela metade a incidência e as mortes causadas pela tuberculose em relação aos dados de 1990 (WHO, 2012). De acordo com informações recentes do Sistema de Vigilância em Saúde, o Brasil obteve nas duas últimas décadas uma redução global do número de casos e de óbitos por TB. Para o ano de 2013, o Ministério da Saúde (MS) estabeleceu como prioridades a ampliação do diagnóstico com implantação de nova tecnologia e o fortalecimento das ações contra a doença na atenção básica. Além disso, o enfrentamento aos determinantes sociais da TB também se consolidam como meta, haja vista que a doença tem relação direta com a miséria e a exclusão social (BRASIL, 2013).

No entanto, nosso país ainda possui cerca de 50 milhões de pessoas infectadas e em 2011 foram notificados 69 mil novos casos, colocando o Brasil em 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo. Apesar de a incidência ter diminuído nos últimos 20 anos, a TB ainda é endêmica no Brasil sendo a quarta causa de mortes por doenças

infecciosas, nos colocando como o país da América Latina com maior índice de casos da doença (BRASIL, 2012).

Apesar dos resultados promissores na epidemiologia da doença, o número de casos de TB ainda é muito elevado em todo o mundo. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com o *M. tuberculosis*, e que em 2013 ocorreram nove milhões de novos casos (13% coinfectados com HIV) e 1,5 milhões de mortes. Segundo a OMS, caso não haja controle da infecção, em 2020 mais de um bilhão de pessoas estarão infectadas com o bacilo e cerca de 15 milhões morrerão em decorrência da enfermidade (WHO, 2014).

Geograficamente as regiões com maior número de casos da doença ainda são a Ásia e a África. Índia e China acumulam quase 40% dos casos, enquanto as regiões do Sudeste Asiático e o Ocidente do Pacífico são parte dos 60% dos casos. A região da África tem aproximadamente um quarto dos casos de TB do mundo e as maiores taxas de incidência e morte populacional (Figura 1).

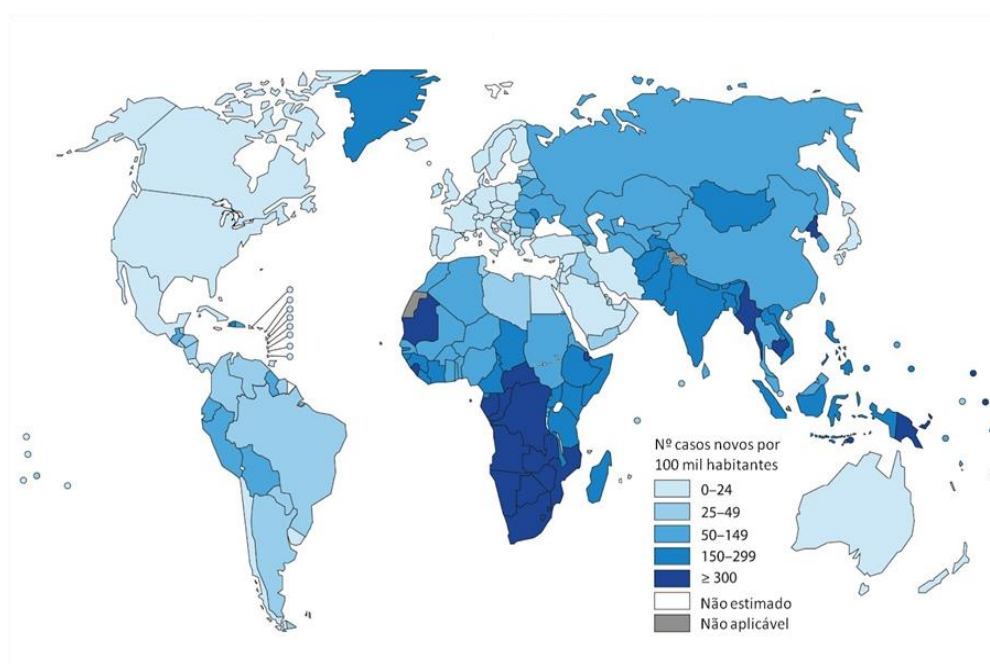


FIGURA 1: Mapa com a estimativa do número de casos novos de tuberculose no mundo em 2012.
Fonte: Adaptado de WHO (2013).

2.2. O agente etiológico: *Mycobacterium tuberculosis*

O *Mycobacterium tuberculosis*, também conhecido como bacilo de Koch, é um patógeno intracelular muito bem sucedido no seu processo de infecção. O Mtb pertence à ordem Actinomycetales, subordem Corynebacteriaceae, família Mycobacteriaceae e gênero *Mycobacterium*. O complexo *Mycobacterium tuberculosis*, do qual o Mtb faz parte, é composto por outras sete espécies de micobactérias, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. pinnipedii*. As duas primeiras espécies são os principais causadores de TB em humanos (ROBERTS et al., 1991).

A estrutura morfológica do Mtb consiste em bastonetes finos e retos, sem mobilidade, aeróbicos, não produtores de esporos ou toxinas. O tamanho dos bastonetes pode variar de 1 a 4 µm com 0,2 a 0,6 µm de diâmetro. O cultivo do Mtb é demorado, pois o processo de duplicação do bacilo leva em torno de 16 a 20 horas, dependendo da oferta de nutrientes e oxigênio além do pH do meio. Para o crescimento da bactéria *in vitro*, podem ser utilizados meios de cultura enriquecidos, sólidos ou líquidos, como Lowenstein- Jensen e Middlebrook 7H9 ou 7H11 (CRUMP et al., 2003; ADLER et al., 2005).

Os bacilos de Koch são resistentes a muitos desinfetantes e corantes comuns usados em laboratórios. Isso se deve a composição da parede celular que é rica em lipídios o que torna a superfície da bactéria hidrofóbica. Mesmo sendo classificados como bastonetes Gram-positivos, a coloração por essa técnica é difícil, pois cora o bacilo de forma fraca, logo não costuma ser utilizada para identificação. A coloração de escolha para detecção da bactéria é o método de Ziehl- Nielsen, pois o complexo composto por ácidos micólicos (ácido graxo de cadeia longa), arabinogalactanas e peptideoglicanos da parede celular formam uma barreira hidrofóbica que retém a fucsina e não é descorado pelo álcool-ácido. Portanto, o Mtb é classificado como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (ADEREM & UNDERHILL, 1999).

A composição da parede celular do Mtb é essencial para o crescimento e sobrevivência da bactéria no hospedeiro e as drogas antimicobacterianas mais eficientes são aquelas capazes de inibir a biossíntese dos componentes da parede bacteriana. Essa estrutura morfológica única das micobactérias, que

confere ao patógeno uma superfície com baixa permeabilidade, é considerada um dos fatores chave que geram a resistência aos antibióticos e quimioterápicos mais comuns (CHATTERJEE, 1997). Além disso, a parede fornece suporte mecânico e protege o conteúdo da célula bacteriana (GOROCICA et al., 2005) como ilustrado na Figura 2.

O envelope de Mtb é composto por três estruturas, a membrana citoplasmática, a parede celular e a cápsula externa. A composição da membrana é compartilhada pela família Actinomycetales (MAHAPATRA et al., 2005), sendo formada por fosfolipídios. Nela também se encontram ancorados alguns glicolipídios como o fosfatidilinositol, manosídeos, lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM). Estes se estendem até a parte externa da parede celular. A parede celular apresenta uma grande quantidade de lipídios sendo recoberta por uma camada espessa de peptideoglicanos. A cápsula externa representa o conjunto de componentes do envelope e não é bem diferenciada das outras camadas. Nela estão as proteínas, polissacarídeos e alguns lipídios. Uma das proteínas presentes na cápsula e na parede celular é o antígeno 85c (Ag85c), que participa na síntese dos ácidos micólicos e contribui com a integridade da parede celular do Mtb (DRAPER et al., 2005).

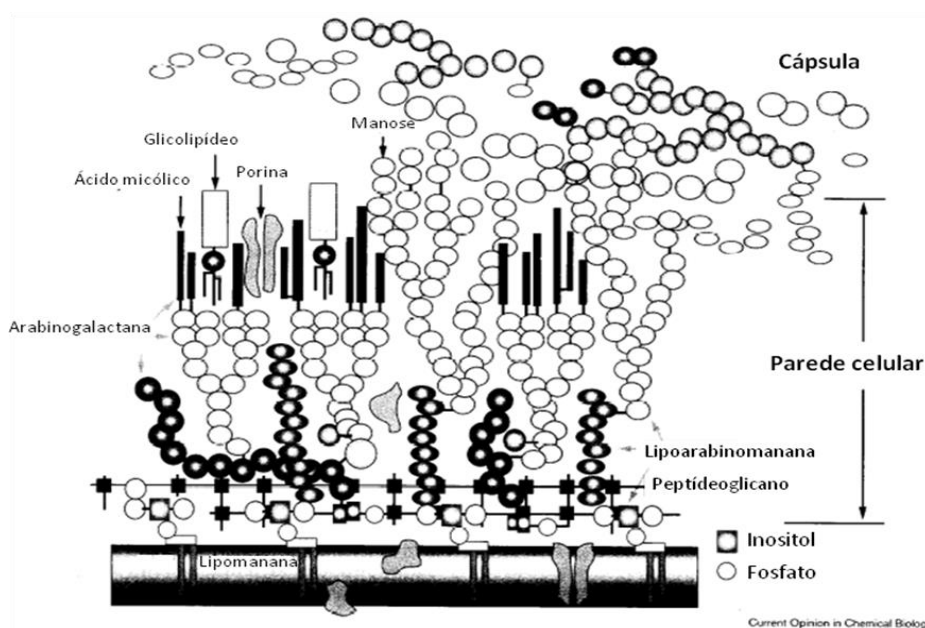


FIGURA 2: Modelo da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis*.
Fonte: Adaptado de CHATTERJE (1997).

2.3. Patogenia da tuberculose e resposta imune

A transmissão do bacilo da tuberculose ocorre de uma pessoa com TB ativa para outra pessoa susceptível, por meio da fala, do espirro e, principalmente, da tosse devido às gotículas que são liberadas e que contêm em seu interior, o patógeno. Essas gotículas são pequenas o suficiente para ficarem em suspensão no ar por muitas horas, o que facilita ainda mais a transmissão (RUSSELL et al., 2010). O órgão alvo de infecção do bacilo é geralmente o pulmão (TB pulmonar), contudo outros sítios podem ser acometidos caracterizando a TB extrapulmonar (WHO, 2012).

Na TB pulmonar, quando o bacilo alcança o órgão alvo, a primeira linha de defesa no combate à bactéria é formada principalmente por macrófagos alveolares, células dendríticas e granulócitos presentes no pulmão (GONZALEZ-JUARRERO et al., 2003). Dados da literatura mostram que tanto em humanos como em camundongos, os macrófagos alveolares, por meio dos receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRR), como receptores para a porção Fc de imunoglobulinas, manose, complemento, CD14 e CD43 (PETERSON et al., 1995; RANDHAWA et al., 2005) podem reconhecer os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes na micobactéria (componentes estruturais como proteínas e glicolipídios, por exemplo). A partir dessa interação, os macrófagos são então ativados e dão início a sua atividade de fagocitose do Mtb. No entanto, o bacilo possui diversos mecanismos de inibição da atividade dos macrófagos, como a inibição da fusão do lisossoma com o fagossoma, a capacidade de se reproduzir no interior de endossomas, além de conseguir modular o padrão de morte celular das células infectadas (FLYNN & CHAN 2001).

Os macrófagos alveolares infectados passam a produzir citocinas como o TNF- α e a IL-12, além de quimiocinas que irão recrutar outras células para o local da infecção como monócitos, neutrófilos e, posteriormente, linfócitos. O TNF- α é uma citocina pró- inflamatória que possui ação microbicida em macrófagos humanos infectados pelo *M. tuberculosis*, além de agir diretamente na formação do granuloma e contenção da micobactéria em macrófagos de camundongos.

Após uma multiplicação inicial nesses macrófagos, essas células entram em apoptose e os corpos apoptóticos são capturados por neutrófilos e células dendríticas (DCs) locais. As DCs carregam o antígeno até os linfonodos drenantes torácicos ou até o parênquima pulmonar, desenvolvendo um foco inflamatório local e levando ao recrutamento de mais células mononucleares dos vasos sanguíneos próximos, o que facilita a disseminação bacteriana (BARNES et al., 1990).

Estudos *in vitro* com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de humanos demonstraram que DCs infectadas pelo Mtb expressam CD54 e CD80, além de secretarem diversas citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-12 (UNDERHILL et al., 1999). Análises do perfil de citocinas produzidas após a infecção pelo Mtb revelaram que macrófagos derivados de monócitos infectados pelo bacilo secretam IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10. Além disso, foi visto que células dendríticas derivadas de macrófagos produziam níveis baixos de IL-12p70 e quantidades elevadas de IFN- γ (GIACOMINI et al., 2001). As citocinas são muito importantes na infecção pelo *M. tuberculosis*, pois agem no recrutamento de células que atuarão diretamente na resposta contra a bactéria para a formação e manutenção do granuloma e, conseqüentemente contenção da infecção.

As DCs contendo o bacilo, que migram para os linfonodos drenantes, entram em apoptose liberando os antígenos peptídicos micobacterianos que são processados e apresentados para as células T virgens específicas por DCs residentes ativadas, principais produtoras de IL-12 na infecção pelo Mtb (COOPER et al., 1997; FLYNN & CHAN 2001). Durante a apresentação as células T são ativadas, pela influência da IL-12 produzida por DCs e macrófagos infectados, entram em expansão tornando-se células efetoras (TCD4⁺ e TCD8⁺) e saem do linfonodo para alcançar a circulação sanguínea, pelos vasos linfáticos eferentes e pelo ducto torácico. A IL-12 é uma citocina crucial durante a infecção, pois melhora o reconhecimento de antígenos do *M. tuberculosis* pelos linfócitos T, promovendo a proliferação dessas células que produzem IL-2, um fator de crescimento para os linfócitos durante a fase inicial de expansão celular. As células TCD4⁺ ao se diferenciarem em células Th1, após receberem o estímulo dos antígenos micobacterianos, se constituem em um componente importante no

processo de contenção bacteriana pela produção de IFN- γ . Essa citocina contribui para recrutamento de células mononucleares como macrófagos e monócitos para a formação do granuloma, e o combate à replicação do bacilo (SAUNDERS et al., 2002). Somado a isso, ocorre um maior recrutamento de linfócitos T citotóxicos para o foco infeccioso, e um aumento da produção de IFN- γ por células *natural killer* (NK) e linfócitos TCD4⁺ produtores não só de IFN- γ , mas também de TNF- α , sob influencia da IL-12. O IFN- γ atua induzindo a produção de TNF- α pelos monócitos infectados pelo Mtb que, por sua vez, induz a produção de IFN- γ pelas células NK (SAMPAIO et al., 1992).

Na tuberculose em humanos, as células NK regulam diferentes aspectos da resposta imune, pois apresentam maior citotoxicidade contra os macrófagos infectados com o bacilo e aumentam a capacidade dos linfócitos TCD8⁺ em produzirem IFN- γ e serem ativados, promovendo assim uma conexão entre a resposta imune inata e a adaptativa na TB (FENG et al., 1999; SERBINA et al., 2000). A atividade citotóxica das células TCD8⁺ é mais evidente quando reconhecem os antígenos micobacterianos apresentados por DCs ou por macrófagos infectados, via MHC de classe I e moléculas CD1 (LEWINSOHN et al., 1998; FLYNN & CHAN 2001). Uma vez ativados, esses linfócitos produzem TNF- α além do IFN- γ , que são ativadores potentes de macrófagos infectados. Além disso, as células TCD8⁺ podem eliminar células infectadas via Fas/ FasL ou por meio da liberação de perforinas e granzimas, induzindo a apoptose celular (BROOKES et al., 2003).

Em relação às células B, por mais de 100 anos os pesquisadores buscam compreender a eficácia da imunidade humoral na TB, entretanto, o papel desses linfócitos ainda é controverso, pois as informações obtidas em trabalhos realizados com animais e humanos são inconsistentes e, às vezes, contraditórias (GLATMAN-FREEDMAN & CASADEVALL, 1998). Dentre as funções atribuídas a essa população celular estão: a secreção de imunoglobulinas, a produção de citocinas, a apresentação de antígenos, sendo capazes de ativar os linfócitos T, além de se ligarem aos microrganismos facilitando a fagocitose dos mesmos (HOFT, 2008). Para a produção de anticorpos específicos é necessária a atuação de células Th1 e Th2, que induzem as células B a secretarem imunoglobulinas que favorecem a eliminação do antígeno (pela ativação do sistema complemento,

por exemplo), mas em outros momentos facilitam a entrada do microrganismo na célula (ABEBE & BJUNE, 2009; MAGLIONE & CHAN, 2009). Como o Mtb é um antígeno intracelular, ele não é exposto à ação dos anticorpos. Contudo, no início da infecção, os anticorpos sozinhos ou em conjunto com as citocinas, possuem um papel efetivo prevenindo a entrada da bactéria na superfície de mucosas. Além disso, já foi observada a participação dos anticorpos em infecções crônicas como a induzida pelo Mtb (RELJIC & IVANYI, 2006; FENG et al., 2011). Um trabalho realizado por BOYTON & OPENSHAW (2002) mostrou que anticorpos das classes IgG, IgA e IgM podem ser detectados nas secreções da mucosa do trato respiratório inferior de humanos infectados pelo bacilo. Alguns estudos também demonstraram a presença de IgG e IgM, específicos contra proteínas do Mtb, no soro de indivíduos com tuberculose (RABAHI et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008; COSTA et al., 2011; LIMONGI et al., 2011; FENG et al., 2011). Em um estudo recente realizado por TORRADO et al. (2013), camundongos que apresentavam linfócitos B incapazes de secretar imunoglobulinas, mesmo tendo uma população de células B ativas acumuladas no pulmão, foram mais susceptíveis a infecção por via aérea pelo Mtb quando comparados aos camundongos selvagens ou mesmo aos que não tinham linfócitos B. A maior sensibilidade dos animais não estava relacionada a problemas na ativação de células T ou a uma resposta do tipo Th1. Essa susceptibilidade no pulmão foi associada à elevada expressão de citocinas como IL-6, GM-CSF, IL-10 e outras moléculas produzidas por macrófagos ativados. Os autores concluíram que os linfócitos B podem modular a imunidade contra o Mtb em um órgão específico, atuando na produção de citocinas e ativação de macrófagos.

O estabelecimento da infecção nos macrófagos com subsequente recrutamento de outras células do sistema imune promove a estrutura organizada do granuloma (DANNENBERG, 1991). Após a infecção inicial, antes do estabelecimento da resposta adaptativa, ocorre a formação de granulomas epitelióides, fase caracterizada pela presença de lesões exsudativas com reação inflamatória aguda com leucócitos ao redor dos bacilos. Em 90% dos casos esse tipo de exsudato é absorvido e ocorre a cicatrização (DAVIS & RAMAKRISHMAN, 2009). Forma-se uma região central onde existem células gigantes multinucleadas contendo os bacilos, que são rodeadas por macrófagos espumosos e células

epitelióides. Na zona periférica estão as células mononucleares, entre estas os linfócitos T e B associados a uma bainha de matriz extracelular e fibroblastos (RUSSEL et al., 2010), como ilustrado na Figura 3B e 3D. A zona central ao apresentar necrose torna-se caseosa e é denominada tubérculo. Em seguida, ocorre cicatrização por tecido fibroso ou calcificação (COSMA et al., 2003). Alguns estudiosos da TB afirmam que o granuloma é benéfico para o indivíduo pela contenção micobacteriana (ULRICHS & KAUFMANN, 2006). Entretanto, outros sugerem que a formação granulomatosa é uma ferramenta do *Mtb* para a expansão no organismo hospedeiro (DAVIS & RAMAKRISHMAN, 2009).

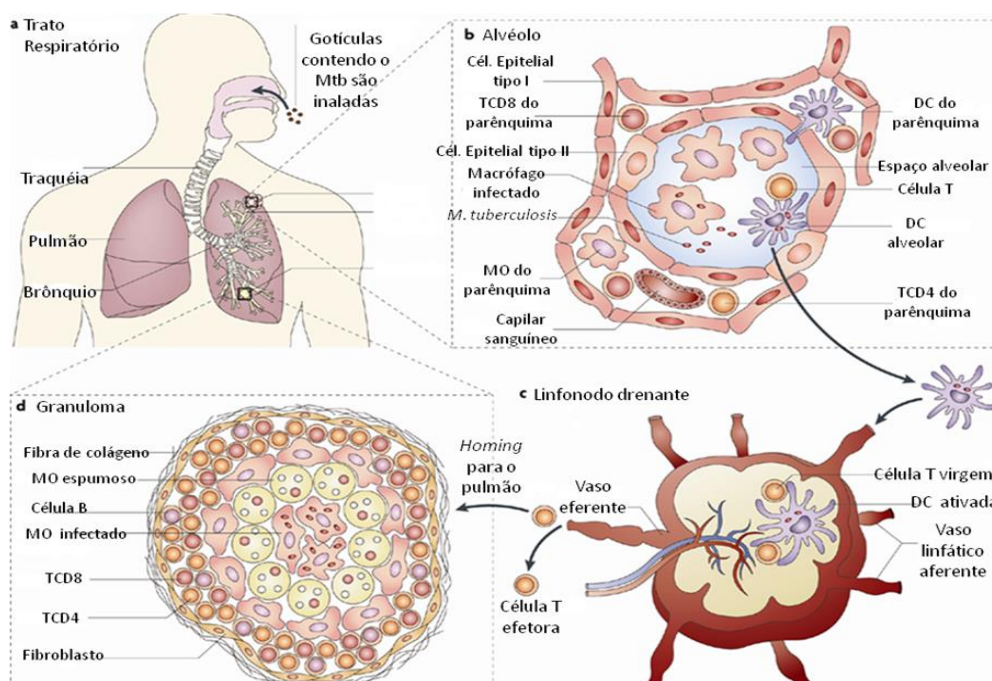


FIGURA 3: Esquema da formação do granuloma na tuberculose humana. Fonte: adaptado de GRIFFITHS et al., 2010.

Ao longo de sua evolução o *Mtb* desenvolveu estratégias eficientes para sobreviver e se replicar nas células alvo de seus hospedeiros. Entre os mecanismos utilizados pela bactéria podem-se citar a prevenção da fusão do fagossomo com o lisossomo pela inibição da acidificação do fagossomo, a expressão de proteínas de virulência, a proteção contra os reativos do oxigênio, a inibição de citocinas protetoras como a IL-12 e o TNF- α , a evasão do processo de apresentação de antígeno (BAENA et al., 2009; MEENA et al., 2010; TISCHLER

et al., 2010; NAIR et al., 2011) e a inibição da apoptose (KEANE et al., 2000). Com o auxílio desses mecanismos o bacilo consegue sobreviver por muito tempo no organismo hospedeiro. Algumas dessas estratégias utilizadas pela bactéria já foram esclarecidas, no entanto, outras ainda precisam ser elucidadas por completo. O entendimento da interação do patógeno com seu hospedeiro é muito útil no combate ao microrganismo e já se sabe que muitas proteínas produzidas pelo Mtb estão envolvidas nos processos de sobrevivência e manutenção da infecção causada por este agente (BAHT et al., 2012).

2.4. Proteínas do *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis produz e secreta uma série de proteínas que possuem fundamental importância na sua sobrevivência e na patogênese da TB. Muitas dessas proteínas funcionam como antígenos que estimulam as células do sistema imunológico do hospedeiro e induzem a resposta imune contra o agente.

Um estudo realizado por KRUH et al. (2010) utilizando cobaias infectadas por via aérea com *Mycobacterium tuberculosis*, identificou mais de 500 proteínas presentes durante o curso da infecção. As duas maiores classes de proteínas identificadas foram as envolvidas no processamento da parede celular e no metabolismo da bactéria. A terceira classe de proteínas mais abundantes foi a da família PE-PPE, que até então não era bem caracterizada, mostrando uma expressão consistente durante a infecção. No ano de 2013 diversos estudos caracterizaram novas proteínas como possíveis alvos de drogas ou vacinas contra a TB (JIANG et al., 2013; LEWINSONHN et al., 2013; SESHADRI et al., 2013).

Algumas proteínas, como as proteases, participam de processos biológicos fundamentais para a viabilidade e virulência de patógenos, no entanto existe pouca informação a respeito do papel potencial dessas enzimas nas doenças causadas por micobactérias (RIBEIRO-GUIMARÃES & PESSOLANI, 2007). As proteases são enzimas amplamente distribuídas na natureza envolvidas na hidrólise das ligações peptídicas de proteínas ou de fragmentos peptídicos modificando os seus substratos com consequências importantes para a biologia

de diversos organismos. Essas enzimas são consideradas potenciais alvos terapêuticos devido às funções que desenvolvem nos ciclos de vida dos microrganismos, podendo atuar no metabolismo e diferenciação, assim como em muitos aspectos da interação do parasito com o hospedeiro, tais como a migração tecidual, a invasão celular, a nutrição e a modulação de resposta imunológica (KLEMBA & GOLDBERG, 2002).

Durante o sequenciamento do genoma do *M. tuberculosis* H37Rv, foram descobertas as famílias PE e PPE de proteínas, compreendendo 10% das regiões codificadoras do genoma da bactéria (COLE et al., 1998), sendo famílias exclusivas de micobactérias (BAHT et al., 2012). Alguns estudos já comprovaram o envolvimento dessas proteínas na variação antigênica e na indução da resposta humoral e celular no hospedeiro. Proteínas da família PE (Rv0746, Rv1759 e Rv1818c) estão relacionadas com a evasão da resposta imune bem como com a variação antigênica (COLE et al., 1998; DELOGU et al., 2001; BANU et al., 2002; BRENNAN et al., 2002) e alguns membros das duas famílias como a Rv1818c, Rv1917c e Rv3873 estão associados à parede celular da bactéria (BRENNAN, 2003; DELOGU et al., 2004). A Rv1818c age influenciando na interação do patógeno com o macrófago (BRENNAN et al., 2001), enquanto a Rv2430c induz uma forte resposta de células B (CHOUDHARY et al., 2003). Outros membros das famílias PE e PPE de proteínas estão relacionados com a virulência da micobactéria (RAMAKRISHNAN et al., 2000; CHOUDHARY et al., 2003; LI et al., 2005). Também já foi confirmado que as proteínas das famílias PE/ PPE modulam as funções protetoras de macrófagos, a secreção de citocinas e os processos de apoptose e necrose das células do hospedeiro (LI et al., 2005; DHEENADHAYALAN et al., 2006; BALAJI et al., 2007; BASU et al., 2007).

A PPE18 (Rv1196), também conhecida como Mtb39a, é mais expressa no *M. tuberculosis* quando comparado ao *M. bovis* (REHREN et al., 2007). NAIR et al. (2009) documentaram que esta proteína utiliza o receptor semelhante a toll 2 (TLR2) para se ligar aos macrófagos, aumentando a produção de IL-10 e diminuindo a produção de IL-12 e TNF- α , favorecendo uma resposta do tipo Th2. Outros estudos realizados pelo grupo comprovaram que macrófagos infectados com uma cepa mutante de Mtb que não possuía a PPE18 produziram menos IL-10 e mais IL-12p40 comparados com os infectados com a cepa selvagem. BHAT

et al. (2012) buscando elucidar o papel da PPE18 na infecção pelo Mtb, infectaram camundongos com uma cepa knock out para a proteína (*ppe18* KO). Os autores verificaram que os animais infectados com a *ppe18* KO apresentaram menor carga bacteriana, menor dano tecidual e melhores taxas de sobrevivência quando comparados com os animais infectados com o tipo selvagem.

Um grupo importante de enzimas é o das caseinolíticas (Clp), que são serina proteases altamente conservadas, presentes em uma diversidade de bactérias, plantas e também em mamíferos (PORANKIEWICZ et al., 1999). Diferente de outras bactérias que apresentam uma única subunidade proteolítica ClpP, o Mtb codifica um complexo enzimático formado pela associação de duas subunidades proteolíticas, ClpP1 e ClpP2, que são adaptadores de ATPase (RAJU et al., 2012). O genoma do *Mycobacterium tuberculosis* contém dois genes homólogos que codificam a ClpP, o *clpP1* e *clpP2*, e acredita-se que eles sejam codificados em um mesmo operon (PERSONNE et al., 2013). MUTTUCUMARU et al., (2004) verificaram que os genes *clpP1* e *clpP2* são altamente expressos pelo *M. tuberculosis* tanto em ambiente aeróbico como em situações de hipóxia. Além disso, já foi comprovado que esse complexo ClpP é necessário para o crescimento e replicação da bactéria, como no estudo desenvolvido por CARROLL et al. (2011) que, utilizando uma cepa *knock down* para ClpP1P2, observaram uma redução no crescimento da bactéria *in vitro* e a não replicação em macrófagos infectados.

Dados que corroboram com estes estudos são os de RAJU et al. (2012) que, utilizando estratégias de complementação e recombinação, substituíram um promotor endógeno dos genes *clpP1* e *clpP2* em *Mycobacterium smegmatis* por um promotor induzido por tetraciclina. Não houve crescimento bacteriano da cepa recombinante na ausência do indutor de tetraciclina, no entanto, esse crescimento foi restaurado na presença de plasmídeos que continham tanto o *clpP1* quanto o *clpP2* de *M. tuberculosis*. Plasmídeos que continham apenas o *clpP1* ou o *clpP2*, não foram capazes de retomar o desenvolvimento bacteriano e a deleção de cada subunidade resultou na morte da bactéria. Segundo os autores, uma vez que a complementação foi realizada com os homólogos de Mtb e subunidades de diferentes espécies, o complexo ClpP1P2 é provavelmente muito semelhante em *M. smegmatis* e em *M.*

tuberculosis. Além disso, RAJU et al. (2012) também confirmaram que o complexo ClpP1P2 participa na remoção de proteínas anormais que podem ser produzidas durante o metabolismo da bactéria, agindo como uma chaperonina.

Outro grupo de enzimas que desenvolve um importante papel na fisiologia e na fisiopatologia do Mtb são as lipolíticas. O *M. tuberculosis* apresenta em seu genoma 250 genes que codificam enzimas envolvidas na síntese ou na degradação de lipídios. Esta característica combinada com a quantidade de lipídios do patógeno representa de 30 a 40% do peso da bactéria, o que sugere que os lipídios e as enzimas lipolíticas possuem um importante papel no ciclo de vida da micobactéria e, provavelmente, na sua virulência (DEDIEU et al., 2013). Sabe-se que os lipídios e glicolipídios que compõem a parede celular da micobactéria são considerados como os maiores determinantes da virulência do patógeno (NEYROLLES et al., 2011). No entanto, ao contrário dos lipídios associados à membrana como o ácido micólico ou o fosfatidil inositol manosídio, que são amplamente estudados, os lipídios intracitoplasmáticos produzidos pela bactéria durante a infecção são negligenciados (GARTON et al., 2002). Esses lipídios intracitoplasmáticos provavelmente derivam dos lipídios da membrana celular do hospedeiro e o Mtb os usa como fonte de carbono e energia (armazenando-os em forma de triacilglicerol- TAG) durante o estágio de latência (CÔTES et al. 2007; SCHUÉ et al., 2010; DANIEL et al., 2011).

Estudos de imunocitocalização revelaram que diversas enzimas lipolíticas do Mtb, que são componentes estruturais da membrana bacteriana, quando se associam com a parede celular podem aumentar a possibilidade de desenvolverem um papel de degradação enzimática dos lipídios da célula do hospedeiro. A localização dessas proteínas na superfície celular também sugere que elas possam participar na modulação da resposta imune (MISHAR et al., 2008; SHANAHAN et al., 2010) e/ ou na invasão das células do hospedeiro (CÔTES et al., 2007; BAKALA et al., 2010; SCHUÉ et al., 2010).

Análises *in silico* identificaram a presença de aproximadamente 30 genes que, supostamente, codificam enzimas lipolíticas, incluindo 24 lipases, pertencentes à família conhecida como Lip (LipC até LipZ). A LipY (Rv3097c), por exemplo, é uma enzima lipolítica que tem capacidade de hidrolisar inclusões intracelulares de lipídios que contenham TAG (DEB et al., 2006; MISHRA et al.,

2008). Em condições de privação de nutrientes, a expressão do gene *lipY* é altamente induzida no *M. tuberculosis* seguida por uma eficiente utilização do triacilglicerol acumulado na ausência de outra fonte de carbono. DEDIEU et al. (2013) utilizando análises *in vitro*, observaram que uma cepa de Mtb mutante que não apresentava o *lipY* não foi capaz de hidrolisar o triacilglicerol (TAG). Com estes resultados os autores inferiram que a LipY é responsável pela utilização do TAG acumulado no citoplasma da bactéria durante o estágio de latência e/ ou durante a saída deste estágio, permitindo assim a reativação da micobactéria.

Uma lipoproteína do Mtb que também vem sendo estudada é a MPT83 (Rv2873). Apesar de alguns autores sugerirem que essa proteína possui um papel na adesão às células do hospedeiro e na disseminação do Mtb, sua real função ainda é desconhecida (HEWINSON et al., 1996). A MPB83, proteína homóloga a MPT83 produzida pelo *M. bovis*, é um antígeno dominante presente no soro de bovinos infectados pelo *M. bovis* (WIKER et al., 1998). Estudos com bovinos imunizados com a vacina de DNA revelaram que a MPB83 é imunogênica e gera uma forte resposta de células T e B (VORDERMEIER et al., 2000; CAI et al., 2005). Animais que foram pré-tratados com anticorpos contra a MPB83 sobreviveram mais tempo após a infecção com *M. bovis* (CHAMBERS et al., 2004). Estudos *in vitro* com *M. tuberculosis* mostraram que a bactéria expressa níveis relativamente baixos de MPB83 e MPB70, mas ocorre um aumento nos níveis de MPT83 durante a infecção (HEWINSON et al., 1996).

KAO et al. (2012) comprovaram a capacidade protetora da MPT83 em camundongos infectados com Mtb por aerosol, bem como a imunogenicidade da vacina que induziu níveis elevados de células T produtoras de IFN- γ no grupo imunizado. Além disso, a proteína foi reconhecida pelas células T de pacientes com tuberculose ativa, que proliferaram e produziram IFN- γ . Um estudo realizado por SESHADRI et al. (2013) investigou a resposta de células T policlonais de humanos infectados com Mtb a antígenos imunodominantes da parede da bactéria. Os autores observaram que as lipoproteínas são alvos das células T, capazes de ativar uma resposta de linfócitos TCD4⁺ produtores de IFN- γ , se caracterizando como uma classe imunodominante de antígenos associados à parede celular. Os autores confirmaram esse dado utilizando uma cepa de Mtb

que não apresentava a enzima LspA, responsável pela síntese de lipoproteína, e verificaram a perda da resposta de células T policlonais.

Proteases que se encontram amplamente distribuídas em procariotos e eucariotos são as pertencentes ao grupo das metaloproteases. Essas enzimas apresentam massas moleculares entre 17 e 800 kDa e sua principal característica é a presença de um cátion bivalente no sítio ativo. Acredita-se que este íon ajude na marcação da ligação peptídica a ser clivada ou estabilize o sítio catalítico durante o mecanismo enzimático. A família M18 de metaloproteases possui cerca de 600 membros, compreendendo enzimas de leveduras, fungos, bactérias e mamíferos (RAWLINGS et al., 2004). Algumas enzimas desta família apresentam estrutura semelhante a do proteassoma celular, tendo uma cavidade interna alinhada aos sítios ativos da protease e dois canais estreitos que conduzem a região central da estrutura, onde apenas polipeptídeos desdobrados tem acesso. A ação de algumas dessas enzimas é independente de energia e, sozinhas ou em conjunto com outras enzimas, clivam e eliminam resíduos peptídicos gerados pelo proteassoma celular (TAMURA et al., 1998). Ademais, também podem fazer parte de um mecanismo de resgate desses polipeptídeos, em casos onde o proteassoma não esteja funcionando corretamente.

Em um estudo com células de mamíferos realizado por GLAS et al. (1998), as mesmas foram expostas progressivamente a um inibidor do proteassoma. As células mostraram um potencial adaptativo produzindo outras proteases em grande quantidade que apresentaram, dentre outras funções, a capacidade de mediar o carregamento de peptídeos para as moléculas de MHC de classe I. Estas proteínas parecem desenvolver papéis importantes no metabolismo celular, entretanto os estudos referentes a esta família, principalmente em doenças causadas por micobactérias ainda são incipientes.

Apenas algumas enzimas da família M18 foram bioquimicamente caracterizadas, incluindo a aminopeptidase I e a yhr113w de leveduras (YOKOYAMA et al., 2006), assim como a DNPEP, uma aspartil- aminopeptidase de mamíferos (CHAIKUAD et al., 2012). Poucas aminopeptidases que clivam substratos ácidos são conhecidas atualmente, apesar de já terem sido reportadas em leveduras, fungos e mamíferos. A mais estudada é a glutamil- aminopeptidase, também chamada de ENPEP ou aminopeptidase A, que está

envolvida no sistema renina angiotensina (RAS), onde catalisa a conversão da angiotensina II em angiotensina III, um regulador chave da pressão arterial em humanos (LI et al., 1993; BANEAS et al., 2006; WRIGHT et al., 2011). Já a DNPEP, por exemplo, possui uma alta atividade enzimática em neurônios e tecidos neuroendócrinos de humanos (WILK et al., 1998; LARRINAGA et al., 2005).

É sabido que um dos agentes causadores da malária, *Plasmodium falciparum*, utiliza interações proteína-proteína e processos enzimáticos para conseguir entrar nos eritrócitos humanos, crescer e escapar dessas células (LAUTERBACH & COETZER 2008). Uma das enzimas que permite o agente realizar esse processo é a PfM18AAP, uma aspartil-aminopeptidase presente no parasito que permite que o mesmo conclua seu ciclo de vida de forma bem sucedida (SPICER et al., 2014).

A protease Rv0800 do Mtb, que é uma aspartil-aminopeptidase, também conhecida como DAP (devido à preferência pelo ácido aspártico como substrato), pertence à família M18 de metalo proteases. Um estudo que comparou os genes codificadores de proteases do *M. leprae* com o Mtb, o *M. bovis* e o *M. avium paratuberculosis* identificou uma alta homologia entre as espécies quando analisou o gene *pepC* codificador da proteína DAP, que foi predita como sendo essencial para sobrevivência *in vivo* e patogenicidade da bactéria (RIBEIRO-GUIMARÃES & PESSOLANI, 2007). Contudo, pouco se sabe sobre as propriedades moleculares e funcionais e se existe alguma relação desta enzima com a imunogenicidade da micobactéria. É possível que, assim como o *P. falciparum*, o Mtb use a sua aspartil-aminopeptidase para interagir com as células do hospedeiro promovendo a infecção. Além disso, o Mtb pode usar a interação da DAP com as células para escapar do sistema imune do hospedeiro. Portanto, por haver pouca informação em relação ao papel dessa enzima na resposta imune contra a tuberculose, existe um grande interesse em estudá-la, pois ela pode apresentar características desejáveis para compor uma formulação vacinal.

2.5. BCG e vacinas de subunidade proteica

A única vacina utilizada há mais de cem anos é a BCG (*Bacillus Calmette- Guérin*). A vacina é rotineiramente administrada em crianças apresentando uma proteção significativa contra as formas severas da tuberculose, a disseminada e a meningocócica. Entretanto, a eficácia protetora da BCG contra a tuberculose pulmonar em adultos é inconsistente e incompleta, e as campanhas de vacinação tem baixo impacto no controle da forma pulmonar, a responsável pela disseminação da doença (OTTENHOFF & KAUFMANN, 2012).

Ainda não está claro porque o efeito protetor da BCG em recém-nascidos e crianças até aproximadamente os 10 anos de vida, começa a declinar na adolescência, nas áreas endêmicas para a tuberculose. Condições sócio-econômicas, nutricionais, genéticas, a alta carga bacteriana circulante, a exposição constante a outras micobactérias, comorbidades (infecção pelo vírus HIV) e co-infecções (por helmintos, por exemplo) que geram imunossupressão, são incriminadas como possíveis causas da falha da BCG (OTTENHOFF & KAUFMANN, 2012). Outra questão preocupante em relação à utilização da vacina BCG são as crianças HIV positivas que apresentam risco elevado de desenvolverem “BCGosi” (disseminação da BCG no organismo) (HESSELING et al., 2007). É evidente que a vacina BCG é insuficiente para o controle mundial da tuberculose. Logo, faz-se necessário o desenvolvimento de vacinas que possam reforçar a resposta protetora já induzida pela BCG, ou mesmo que sejam capazes de substituí-la. Nesse sentido, desde os anos 90 onde não havia candidatos a nova vacina, muitos progressos foram alcançados e hoje já existem 12 vacinas em fase clínica de testes em humanos (OTTENHOFF & KAUFMANN, 2012).

Dentre as abordagens que vem sendo utilizadas pelos grupos de pesquisa da tuberculose estão as vacinas de subunidade proteica. Essa classe de vacinas no contexto da tuberculose é produzida de duas formas, por meio de sistemas de vetores virais ou como proteínas recombinantes associadas a adjuvantes. As vacinas de subunidade proteica apresentam vantagens no quesito segurança quando utilizadas em indivíduos HIV positivos, além de poderem ser usadas sozinhas ou como um *booster* para a vacina BCG (DEY et al., 2011). Para que proteínas do Mtb sejam consideradas como alvos de vacinas de subunidade

contra a TB, elas devem estimular imunidade protetora em modelos experimentais de infecção com o Mtb, devem ser imunogênicas na maioria dos pacientes com a doença ativa, além de não apresentarem reação cruzada com proteínas humanas (KAO et al., 2012).

Um avanço significativo na construção de proteínas recombinantes foi conquistado, sendo a maioria proteínas de fusão que combinam dois ou mais antígenos imunodominantes do Mtb. Essas proteínas normalmente são associadas a potentes adjuvantes indutores de uma resposta imune do tipo Th1. Um estudo realizado pelo laboratório GlaxoSmithKlein (GSK) teve como resultado uma proteína de fusão denominada M72, composta pelos antígenos Rv1196 e Rv0125 (VON ESCHEN et al., 2009) do Mtb. A M72 foi testada como vacina de subunidade proteica em associação aos adjuvantes sintéticos AS01 (Mtb72F-AS01) e AS02 (Mtb72F-AS02) produzidos pelo GSK.

Os primeiros ensaios com a vacina foram realizados em camundongos e cobaias (BRANDT et al., 2004), onde observou-se uma indução significativa de células Th1 específicas para a proteína M72 nos camundongos vacinados com a formulação Mtb72F-AS02. Análises subsequentes demonstraram que as células dos animais imunizados com a BCG sozinha responderam de forma fraca após a estimulação *in vitro* com a vacina Mtb72F. Entretanto, o grupo que recebeu a BCG seguida do reforço com a vacina de subunidade proteica produziu elevados níveis de IFN- γ . Somado a isso, também foi observada uma indução significativa de linfócitos T citotóxicos bem como de anticorpos IgG1 e IgG2a nos animais imunizados com a Mtb72F. No entanto, não houve diferença entre o grupo imunizado apenas com a BCG e o grupo que recebeu o reforço com a Mtb72F nos ensaios de proteção da vacina.

Apesar de não encontrarem diferença significativa na proteção em camundongos, esse resultado foi analisado com cautela pelos autores, pois é de conhecimento geral que o modelo murino apresenta uma proteção limitada na infecção por via aérea com Mtb. Já em cobaias, podem ser discernidas as prováveis diferenças que nem sempre se apresentam tão óbvias no ensaio com camundongos (BALDWIN et al., 1998). Assim, utilizando as cobaias vacinadas no mesmo esquema anterior, os autores observaram que, de cinco animais que compunham o grupo do reforço com a Mtb72F, três sobreviveram até a semana

113 ao final dos experimentos. Os dois primeiros morreram com 52 e 75 dias, respectivamente. As análises histopatológicas do pulmão dos animais sobreviventes mostraram pequenas áreas ocasionais de fibrose e tecido granulomatoso associados a amplas vias aéreas ou vasos sanguíneos. Já os pulmões dos que receberam apenas a BCG apresentaram extensas áreas de consolidação pulmonar com formação de granulomas e infiltrado de linfócitos, o que levou a morte das cobaias.

Análises posteriores em humanos foram realizadas e comprovou-se que a vacina Mtb72F-AS02 foi bem tolerada clinicamente em adultos com PPD negativo, sem relatos de reações adversas (SPERTINI et al., 2013). A vacina foi capaz de induzir células TCD4⁺ polifuncionais específicas para a Mtb72F bem como resposta imune humoral contra a proteína. Foi possível detectar IFN- γ no soro um dia após cada vacinação. Assim, em um estudo também no ano de 2013, a capacidade imunogênica da vacina Mtb72F foi analisada em humanos saudáveis. Os autores verificaram que a formulação vacinal Mtb72F associada aos adjuvantes AS01 ou AS02 foi capaz de induzir resposta específica de linfócitos TCD4⁺, onde foram observadas células expressando dois ou mais marcadores como CD40L, IL-2, TNF- α e IFN- γ , que persistiram até um ano após a imunização dos pacientes (LEROUX-ROELS et al., 2013).

Uma das vacinas mais avançadas atualmente que entrou em fase clínica IIa em 2012, após ter sido testada de forma bem sucedida em camundongos, cobaias e primatas não humanos (OLSEN et al., 2001; OLSEN et al., 2004; LANGERMANS et al., 2005), é a *Hybrid 1*. Ela foi desenhada pelo *Statens Serum Institute*, e é composta pela fusão dos antígenos ESAT6 e Ag85B associada ao adjuvante IC31 (OLSEN et al., 2001). Uma observação interessante foi o elevado nível de resposta imune de longa duração induzida pela vacina, que pôde ser detectada até dois anos e meio após a última imunização. Recentemente, a mesma vacina mostrou-se capaz de resgatar a resposta imune induzida pela BCG ou pela infecção latente com Mtb (VAN DISSEL et al., 2011).

Outra vacina também composta por antígenos fusionados do Mtb (Ag85B e TB10.4, que também é expresso pelo BCG, diferente do ESAT6), a *Hyvac 4*. Em 2005 a vacina foi desenvolvida pela fusão do Ag85B e o TB10.4, um antígeno do Mtb fortemente reconhecido por células de humanos infectados.

Como o ESAT6 é um importante reagente de diagnóstico da TB, surgiu o interesse em substituí-lo por outro antígeno capaz de compor uma vacina com o Ag85B tão eficaz quanto à formulação Ag85B-ESAT6 (OLSEN et al., 2001; OLSEN et al., 2004; LANGERMANS et al., 2005). A vacina Ag85B-TB10.4 também foi associada ao adjuvante IC31 e induziu uma resposta ainda melhor que a formulação com o ESAT6, sendo capaz de proteger camundongos C57BL/6 de forma semelhante a BCG (DIETRICH et al., 2005). Atualmente, a Ag85B-TB10.4 está em fase clínica I (PITT et al. 2013).

Diante dos dados expostos, fica claro que o desenvolvimento de vacinas de subunidade proteica é um caminho promissor no que diz respeito à melhoria da resposta imune induzida pela vacina BCG ou mesmo a substituição desta.

2.6. Adjuvantes utilizados em vacinas contra TB

Adjuvantes são componentes capazes de intensificar e/ou modular a resposta imune específica a determinado antígeno (REED et al., 2013). Eles podem ser classificados como veículos sendo capazes de apresentar os antígenos vacinais ao sistema imune de uma forma mais eficiente, controlando a liberação deste antígeno para aumentar a resposta específica. Também podem ser imunoestimuladores quando agem no sistema imune potencializando a resposta imune específica (MONTOMOLI et al., 2011). Logo, os adjuvantes apresentam um papel essencial na definição e na qualidade da resposta imune induzida pelas vacinas (MACLEOD et al., 2011).

Um adjuvante para compor uma formulação vacinal contra tuberculose precisa ter a capacidade de gerar e manter uma forte resposta do tipo Th1. Poucos adjuvantes são licenciados para o uso em seres humanos e são fracos indutores de resposta do tipo Th1, como hidróxido de alumínio e emulsões a base de esqualeno (JUNQUEIRA-KIPNIS et al., 2014). Entretanto, o hidróxido de alumínio ainda é considerado o mais seguro adjuvante para ser utilizado em vacinas para humanos.

Estudos recentes em camundongos utilizaram o adjuvante CpG DNA como componente de vacina de subunidade proteica associado as proteínas MPT51 (SILVA et al., 2009) e HspX (TRENTINI et al., 2014) do Mtb, que conferiram proteção aos animais vacinados. No trabalho de SOUSA et al. (2012), a associação do CpG DNA a proteína de fusão CMX induziu elevados níveis de anticorpos específicos das classes IgG1 e IgG2a. Este adjuvante é composto por oligonucleotídeos sintéticos que expressam Citosina e Guanina não metilados (WAGNER 1999). O CpG DNA é reconhecido via receptor semelhante a toll 9 (TL-9), um PRR encontrado nos endossomas celulares. Ao ser internalizado por monócitos, macrófagos e DCs, o CpG DNA ativa o TLR-9 que é expresso por essas células (BAUER et al., 2001; KADOWAKI et al., 2001), o que leva a indução de citocinas pró inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α (BODE et al., 2011).

Algumas vacinas que estão em fase de testes clínicos possuem em sua formulação novas moléculas adjuvantes. A vacina Mtb72, por exemplo, foi testada com duas formulações diferentes contendo os adjuvantes AS01 (formulação com lipossoma) e AS02 (emulsão de óleo e água). O AS01 é um bom estimulador do TLR-4 (PRR encontrado na membrana celular que pode ativar duas vias de sinalização que culminam com a produção de citocinas pró-inflamatórias) e desencadeia uma resposta do tipo TCD4 enquanto o AS02 ativa uma resposta de células TCD8, principalmente. Ambos os adjuvantes são compostos por monofosforil lipídeo A (MPL) e o detergente QS-21. O mecanismo de ação do QS-21 não está relacionado com receptores do tipo toll (GARCON et al., 2011). O AS01 mostrou-se protetor e foi um forte indutor de anticorpos das classes IgG1 e IgG2a além de aumentar a produção de linfócitos TCD4⁺ IFN- γ ⁺ e a capacidade citotóxica das células TCD8⁺. Contudo, a formulação contendo o AS02 mesmo sendo uma fraca indutora de resposta imune foi capaz de diminuir a carga bacilar nos pulmões de camundongos (LEROUX-ROELS et al., 2010 e 2013).

Outro adjuvante que compõe formulações vacinais que estão em fase clínica é o IC31: Este é capaz de ativar o TLR-9 humano facilitando a captação de antígenos pelas DCs e, conseqüentemente, promovendo uma liberação lenta deste produto (OTTENHOFF et al., 2010) o que gera uma forte resposta de células TCD4⁺ IFN- γ ⁺ em humanos (VAN DISSEL et al., 2010). Seu mecanismo

de ação está relacionado à ativação de receptores toll nos endossomas, o que o torna um bom adjuvante para ser usado em vacinas contra microrganismos intracelulares.

O GLA-SE (lipídeo glucopiranosil), outro agonista de TLR-4 também tem sido usado como adjuvante na vacina ID93. BALDWIN et al. (2012) demonstraram que a proteção gerada pela vacinação estava associada a uma forte resposta Th1 com o aumento de células polifuncionais, produtoras de IL-2, TNF- α e IFN- γ . A formulação vacinal ID93-GLA-SE foi capaz de melhorar a proteção gerada pela BCG além de atenuar a infecção multi-droga resistente em camundongos, cobaias e macacos.

O interesse no desenvolvimento de novas moléculas adjuvantes ressurgiu recentemente. Isso tem sido estimulado pela necessidade de se combater graves patógenos como, HIV, SARS, vírus das influenzas e hepatites e também o *Mycobacterium tuberculosis*. Uma grande limitação no desenvolvimento de vacinas de subunidade proteica é a baixa imunogenicidade das proteínas recombinantes, o que torna necessário o uso de adjuvantes potentes e seguros para o uso em humanos (SILVA et al., 2004).

Com o presente estudo objetivou-se avaliar diferentes formulações vacinais contendo uma protease de Mtb associada a duas novas moléculas adjuvantes em modelo murino.

REFERÊNCIAS

1. ABEBE, F.; BJUNE, G. The protective role of antibody response during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 157, p. 235-243, 2009.
2. ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 593-6231, 1999.
3. ADLER, H.; STRAUD, C.; FREI, R. Comparison of Bac T/Alert 3D, Lowenstein-Jensen médium and Middlebrook 7H10/7H11 biplate for recovering mycobacterial from clinical specimes. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 24, p. 449-500, 2005.
4. ALMEIDA, C. M. C; VASCONCELOS, A. C. Jr.; KIPNIS, A.; ANDRADE, A. L.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Humoral immune responses of tuberculosis patients in Brazil indicate recognition of *Mycobacterium tuberculosis* MPT-51 and GlcB. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 15, p. 579-81, 2008.
5. BAENA, A.; PORCELLI, S. A. Evasion and subversion of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*. **Tissue Antigens**, v. 74, p. 189–204, 2009.
6. BAKALA N'GOMA, J. C.; SCHUE, M.; CARRIERE, F.; GEERLOF, A.; CANNAN, S. Evidence for the cytotoxic effects of *Mycobacterium tuberculosis* phospholipase C towards macrophages, **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1801, p. 1305-1313, 2010.
7. BALAJI, K. N.; GOYAL, G.; NARAYANA, Y.; SRINIVAS, M.; CHATURVEDI, R.; MOHAMMAD, S. Apoptosis triggered by Rv1818c, a PE family gene from *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by mitochondrial intermediates in T cells. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 271– 281, 2007.
8. BALDWIN, S. L.; D'SOUZA, C. D.; ROBERTS, A. D.; KELLY, B. P.; FRANK, A. A.; LUI, M. A.; ULMER, J. B.; HUYGEN, K.; MCMURRAY, D. M.; ORME, I. M. Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig of tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 66: 2951, 1998.
9. BALDWIN, S. L.; BERTHOLET, S.; REESE, V. A; CHING, L. K.; REED, S. G.; COLER, R. N. The importance of adjuvant formulation in the development of a tuberculosis vaccine. **Journal of Immunology**, v. 188, p. 2189–2197, 2012.
10. BANEGAS, I.; PRIETO, I.; VIVES, F.; ALBA, F.; DEGASPARO, M.; SEGARRA, A. B.; HERMOSO, F.; DURAN, R.; RAMIREZ, M. Brain aminopeptidases and hypertension. **Journal of Renin Angiotensin Aldosterone System**, v. 7, n. 3, p. 129-134, 2006.

11. BANU, S.; HONORE, N.; SAINT-JOANIS, B.; PHILPOTT, D.; PRÉVOST, M. C.; COLE, S. T. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? **Molecular Microbiology**, v. 44, p. 9–19, 2002.
12. BARNES, P. F.; FONG, S. J.; BRENNAN, P. J.; TWOMEY, P. E.; MAZUMBDER, A.; MODLIN, R. L. Local production of tumor necrosis factor and interferon- γ in tuberculosis pleuritis. **Journal of Immunology**, v. 145, p. 149-154, 1990.
13. BASU, S.; PATHAK, S. K.; BANERJEE, A.; PATHAK, S.; BHATTACHARYYA, A.; YANG, Z.; TALARICO, S.; KUNDU, M.; BASU, J. Execution of macrophage apoptosis by PE_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor- α . **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 1039–1050, 2007.
14. BHAT, K. H.; AHMED, A.; KUMAR, S.; SHARMA, P.; MUKHOPADHYAY, S. Role of PPE18 protein in intracellular survival and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Plos One**, v. 7, n. 12: e52601, 2012.
15. BODE, C.; ZHAO, G.; STEINHAGEN, F.; KINJO, T.; KLINMAN, D. M.; CpG DNA as a vaccine adjuvant. **Expert Review Vaccines**, v. 4, p. 499-511, 2011.
16. BOYTON, R. J.; OPENSHAW, P. J. Pulmonary defences to acute respiratory infection. **British Medical Bulletin**, v. 61, p. 1-12, 2002.
17. BRANDT, L.; SKEIKY, Y. A.; ALDERSON, M. R.; LOBET, Y.; DALEMANS, W.; TURNER, O. C.; BASARABA, R. J.; IZZO, A. A.; LASCO, T. M.; CHAPMAN, P. L.; REED, S. G.; ORME, I. M. The protective effect of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine increased by ration with the *Mycobacterium tuberculosis* 72-kDa fusion polyprotein Mtb72F in *M. tuberculosis* infected guinea pigs. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 6622-6632, 2004.
18. BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 43, 2012.
19. BRENNAN, M. J.; DELOGU, G.; CHEN, Y.; BARDAROV, S.; KRIAKOV, J.; Evidence that mycobacterial PE-PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 7326–7333, 2001.
20. BROOKES, R. H.; PATHAN, A. A.; MCSHANE, H.; HENSMANN, M.; PRICE, D. A.; HILL, A. V. CD8⁺ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 33, p. 3293-3202, 2003.
21. BUDDLE, B. M.; WEDLOCK, D. N.; PARLANE, N. A.; CORNER, L. A. L.; DE LISLE, G. W.; SKINNER, M. A. Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduced the level of protection against tuberculosis induced by a single vaccination. **Infection Immunity**, v. 71, p. 6411–6419, 2003.

22. BUDDLE, B. M.; PARLANE, N. A.; WEDLOCK, D. N.; HEISER, A. Overview of vaccination trials for control of tuberculosis in cattle, wildlife and humans. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, suplemento 1, p. 136-146, 2013.
23. CAI, H.; TIAN, X.; HU, X. D.; LI, S. X.; YU, D. H. Combined DNA vaccines formulated either in DDA or in saline protect cattle from *Mycobacterium bovis* infection. **Vaccine**, v. 23, p. 3887-3895, 2005.
24. CARROL, P.; FARAY-KELE, M. C.; PARISH, T. Identifying vulnerable pathways in *Mycobacterium tuberculosis* by using a knockdown approach. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, p. 5040-5043, 2011.
25. CHAIKUAD, A.; PILKA, E.; DE RISO, A.; VON DELFT, F.; KAVANAGH, K. L.; VÉNIEN-BRYAN, C.; OPPERMAN, U.; YUE, W. W. Structure of human aspartyl aminopeptidase complexed with substrate analogue: insight into catalytic mechanism, substrate specificity and M18 peptidase family. **BMC Structural Biology**, v. 12:14, 2012.
26. CHAMBERS, M. A.; GAVIER-WIDEN, D.; HEWINSON, R. G. Antibody bound to the surface antigen MPB83 of *Mycobacterium bovis* enhances survival against high dose and low dose challenge. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 41, p. 93-100, 2004.
27. CHATTERJEE, D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 1, p. 579-588, 1997.
28. CHOUDHARY, R. K.; MUKHOPADHYAY, S.; CHAKHAIYAR, P.; SHARMA, N.; MURTHY, K. J. R.; KATOCH, V. M.; HASNAIN, S. E. PPE antigen Rv2430c of *Mycobacterium tuberculosis* induces a strong B cell response. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 6338–6343, 2003.
29. COLE, S. T.; BROSC, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARREL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, p. 537–544, 1998.
30. COOPER, A. M.; D'SOUZA, C.; FRANK, A. A.; ORME, I. M. The course of *Mycobacterium tuberculosis* infection in the lungs of mice lacking expression of either perforin or granzyme-mediated cytolytic mechanisms. **Infection Immunity**, v. 65, p.1317–1320, 1997.

31. COSMA, C.L.; SHERMAN, D.R.; RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 641–676, 2003.
32. COSTA, A. C.; REIS, M. C. G.; SILVA, B. D. S.; TRENTINI, M. M.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Resposta Imune Humoral ao antígeno rGroES do *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes com tuberculose e seus contatos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, p. 23-34, 2011.
33. CÔTES, K.; DHOUIB, R.; DOUCHET, I.; CHAHINIAN, H.; DE CARO, A.; CARRIERE, F.; CANNAN, S. Characterization of an exported monoglyceride lipase from *Mycobacterium tuberculosis* possibly involved in the metabolism of host cell membrane lipids. **Biochemistry Journal**, v. 208, p. 417-427, 2007.
34. CRUMP, J. A.; TANNER, D. C.; MIRRETT, S.; MCKIGHT AND RELLER, L. B. Controlled comparison of Bactec 13A, MYCO/F LYIC, BacT/ALERT MB, and ISOLADOR 10 systems for detection of mycobacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1987-1990, 2003.
35. DANIEL, J.; MAAMAR, H.; DEB, C.; SIRAKOVA, T. D.; KOLATTUKUDY, P. E. *Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages, **Plos Pathogens**, v. 7: e1002093, 2011.
36. DANNENBERG, A. M. Jr. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology Today*, v. 12, p. 228-233, 1991.
37. DAVIS, J. M.; RAMAKRISHNAN, L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. **Cell**, v. 136, p. 37–49, 2009.
38. DEB, C.; DANIEL, J.; SIRAKOVA, T. D.; ABOMOELAK, B.; DUBEY, V. S.; KOLATTUKUDY, P. E. A novel lipase belongin to the hormone-sensitive lipase family induced under starvation to utilize stored tricylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Biology Chemistry**, v. 281, p. 3866-3875, 2006.
39. DEDIEU, L.; SERVEAU-AVESQUE, C.; KREMER, L.; CANNAN, S. Mycobacterial lipolitic enzymes: A gold mine for tuberculosis research. **Biochimie**, v. 95, p. 66-73. 2013.
40. DELOGU, G.; BRENNAN, M. J. Comparative immune response to PE and PE_PGERS antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 5606–5611, 2001.
41. DEY, B. JAIN, R.; GUPTA, U. D.; KATOCH, V. M; RAMANHATHAN, V. D. A booster vaccine expressing a latency-associated antigen augments BCG induced immunity and confers enhanced protection against tuberculosis. **Plos One**, v. 6: e23360, 2011.

42. DHEENADHAYALAN, V.; DELOGU, G.; BRENNAN, M. J. Expression of the PE_PGRS 33 protein in *Mycobacterium smegmatis* triggers necrosis in macrophages and enhanced mycobacterial survival. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 262–272, 2006.
43. DIETRICH, J.; AAGAARD, C.; LEAH, R.; OLSEN, A. W.; STRYHN, A.; T.; DOHERTY, T. M.; ANDERSEN, P. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. **The Journal of Immunology**, v. 174, p. 6332-6339, 2005.
44. DRAPER, P.; DAFTE, M. The cell envelope of *Mycobacterium tuberculosis* with special reference to the capsule and outer permeability barrier. In: Tuberculosis and the Tubercle bacillus. **American Society for Microbiology Press**, p. 261-273, 2005.
45. FENG, C. G.; BEAN, A. G. D.; HOOL, H.; BRISCOE, H.; BRITTON, W. J. Increase in gamma interferon-secreting CD8+, as well as CD4+ T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 3242-3447, 1999.
46. FENG, L.; LI, L.; LIU, Y.; QIAO, D.; LI, Q.; FU, X.; WANG, H. LAO, S. WU, C. B lymphocytes that migrate to tuberculous pleural fluid via the SDF-1/ CXCR4 axis actively respond to antigens specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Immunology**, v. 41, p. 3261-3269, 2011.
47. FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 93-129, 2001.
48. GIACOMINI, E.; IONA, E.; FERRONI, L.; MIETTINEN, M.; FATTORINI, L.; OREFICI, G.; JULKUNEN, I.; COCCIA, E. M. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 12, p. 7033-7041, 2001.
49. GLAS, R.; BOGOYO, M.; McMASTER, J. S.; GAEZYNSKA, M.; PLOEGH, H. L. A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. **Nature**, v. 392, p. 618-622, 1998.
50. GLATTMAN-FREEDMAN, A.; CASADEVALL, A. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p. 514–532, 1998.
51. GARTON, N.; CHRISTENSEN, H.; MINNIKIN, D.; ADEGBOLA, R.; BARER, M. Intracellular lipophilic inclusions of mycobacteria in vitro and in sputum. **Microbiology**, v. 148, p. 2591-2598, 2002.

52. GARCON, N.; VAN MECHELEN, M. Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing adjuvant systems. **Expert Reviews Vaccines**, v. 10, p. 471–486, 2011.
53. GONZALEZ-JUARRERO, M.; SHIM, T. S.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; ORME, I. M. Dynamics of macrophage cell populations during murine pulmonary tuberculosis. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 3128-3135, 2003.
54. GOROCICA, P.; CARMEM JI-MÉNEZ-MARTINEZ, M. C.; GARFIAS, Y.; SADA, I.; LASCURAIN, R. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en La patogénesis de la tuberculosis. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**, v.18, p.142-153, 2005.
55. GRIFFITHS, G.; NYSTRÖM, B.; SABLE, S. J.; KHULLER, G. K. Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 827-834, 2010.
56. HESSELING, A. C.; MARAIS, B. J.; GIE, R. P.; SCHAAF, H. S.; FINE, P. E. The risk of disseminated Bacille Calmette-Guerin (BCG) disease in HIV-infected children. **Vaccine**, v. 25, p. 14–18, 2007.
57. HEWINSON, R. G.; MICHELL, S. L.; RUSSEL, W. P.; MCADAM, R. A.; JACOBS, W. R. Jr. Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 43, p. 490-499, 1996.
58. HOFT, D. F. Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design and evaluation. **Lancet**, v. 372, p. 164-175, 2008.
59. JIANG, Y.; DOU, X.; ZHANG, W.; LIU, H.; ZHAO, X.; WANG, H.; LIAN, L.; ZHANQ, J.; LI, G.; CHEN, C.; WANK, K. Genetic diversity of antigens Rv2945c and Rv0309 in *Mycobacterium tuberculosis* strains may reflect ongoing immune evasion. **Microbiology Letters**, v. 347, p. 77-82, 2013.
60. KAO, F. F.; MAHMUDA, S.; PINTO, R.; TRICCAS, J. A.; WEST, N. P.; BRITTON, W. J. The secreted lipoprotein, MPT83, of *Mycobacterium tuberculosis* is recognized during human tuberculosis and stimulates protective immunity in mice. **Plos One**, v. 7, n. 5: e34991, 2012.
61. KEANE, J.; REMOLD, H. G.; KORNFELD, H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *Journal of Immunology*, v. 164, p. 2016–2020, 2000.
62. KLEMBBA, M.; GOLDBERG, E. D. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 275-305, 2002.

63. KRUH, N. A.; TROUDT, J.; IZZO, A.; PRENNI, J.; DOBOS, K. M. Portrait of a pathogen: the *Mycobacterium tuberculosis* proteome in vivo. **Plos One**, v. 5, n. 11: e13938, 2010.
64. LANGERMANS, J. A.; DOHERTY, T.M.; VERVENNE, R. A.; LAAN, T.; LYASHCHENKO, K.; GREENWALD, R.; AGGER, E. M.; AAGAAGRD, C.; WEILER, H.; SOOLINGEN, D. Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-9. **Vaccine**, v. 23, p. 2740-2750, 2005.
65. LARRINAGA, G.; CALLADO, L. F.; AGIRREGOITIA, N.; VARONA, A.; GIL, J.; Subcellular distribution of membrane-bound aminopeptidases in the human and rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 383, p. 136-140, 2005.
66. LAUTERBACH, S. B.; COETZER, T. L. The M18 Aspartyl aminopeptidase of *Plasmodium falciparum* binds to human erythrocyte spectrin in vitro. **Malaria Journal**, v. 7, p.161, 2008.
67. LEROUX-ROELS, I.; LEROUX-ROELS, G.; OFORI-ANYINAM, O.; MORIS, P.; DE KOCK, E.; Clement, F. Evaluation of the safety and immunogenicity of two antigen concentrations of the Mtb72F/AS02(A) candidate tuberculosis vaccine in purified protein derivative-negative adults. **Clinical Vaccine and Immunology**, v.17, p. 1763–1771, 2010.
68. LEROUX-ROELS, I.; FORGUS, S.; BOEVER, F. D.; CLEMENT, F.; DEMOITIÉB, M. A.; METTENS, P.; MORIS, P.; LEDENT, E.; LEROUX-ROELS, G.; OFORI-ANYINAMB, O. Improved CD4+ T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* in PPD-negative adults by M72/AS01 as compared to the M72/AS02 and Mtb72F/AS02 tuberculosis candidate vaccine formulations: A randomized trial. **Vaccine**, v. 31, p. 2196-2206, 2013.
69. LEWINSOHN D. M.; ALDERSON, M.; BRIDEN, A.; RIDDELL, S.; REED, S.; GRABSTEIN, K. Characterization of human CD8C T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis*-infected antigen presenting cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 187:1633–1640, 1998.
70. LEWINSOHN, D. M.; SWARBRICK, G. M.; CANSLER, M. E.; NULL, M. D.; RAJARAMAN, V.; FRIEDER, M. M.; SHERMAN, D. R.; MCWEENEY, S.; LEWINSOHN, D. A. Human *Mycobacterium tuberculosis* CD8 T cell antigens/epitopes identified by a proteomic peptide library. **PLoS One**, v.8, n. 6: e67016, 2013.
71. LI, Y.; MILTNER, E.; WU, M.; PETROFSKY, M.; BERMUDEZ, L. E. A *Mycobacterium avium* PPE gene is associated with the ability of the bacterium to grow in macrophages and virulence in mice. **Cell Microbiology**, v. 7, p. 539–548, 2005.
72. LIMONGI, L. C. S.; OLIVAL, L.; CONDE, M. B.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Determination of level of specific IgA to the HspX recombinant antigen of

Mycobacterium tuberculosis for the pleural tuberculosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37, p. 302-307, 2011.

73. MACLEOD, M. K. L.; MCKEE, A. S.; DAVID, A.; WANG, J.; MASON, R.; KAPPLER, J. W.; MARRACK, P. Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells. **PNAS**, v. 108, p. 7914-7919, 2011.

74. MAGLIONE, P. J.; CHAN, J. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Immunology**, v. 39, p. 676–686, 2009.

75. MAHAPATRA, S.; BASU, J.; BRENNAN, P.; CRICK, D. Structure, biosynthesis, and genetics of the Mycolic Acid-Arabinogalactan-Peptidoglycan complex. In **Tuberculosis and the Tubercle bacillus**. ASM Press, Washington DC, p. 275-285, 2005.

76. MAUE, A. C. W. R.; WATERS, M. V.; PALMER, B. J.; NONNECKE, F. C.; MINION, W. C.; BROWN, J.; NORIMINE, M. R.; FOOTE, C. F. C.; SCHERERM; ESTES, D. M. An ESAT-6:CFP10 DNA vaccine administered in conjunction with *Mycobacterium bovis* BCG confers protection to cattle challenged with virulent *M. bovis*. **Vaccine**, 25, 4735–4746, 2007.

77. MEENA, L. S.; RAJNI. Survival mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **The FEBS Journal**, v. 277, p. 2416–2427, 2010.

78. MISHRA, K. C.; CHASTELLIER, C.; NARAYANA, Y.; BIFANI, P.; BROWN, A. K.; BESRA, G. S.; KATOCH, V. M.; JOSHI, B.; BALAJI, K. N.; KREMER, I.; Functional role of the PE domain and immunogenicity of the *Mycobacterium tuberculosis* triacylglycerol hydrolase LipY. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 127-140, 2008.

79. MONTOMOLI, E.; PICCIRELLA, S.; KHADANG, B.; MENNITTO, E.; CAMERINI, R.; DE ROSA, A. Current adjuvants and new perspectives in vaccine formulation. **Expert Reviews Vaccines**, v. 10, p. 1053–1061, 2011.

80. MUTTUCUMARU, D. G.; ROBERTS, G.; HINDS, J.; STABLER, R. A.; PARISH, T. Gene expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* in a non-replicating state. **Tuberculosis**, v. 84, p. 239-246, 2004.

81. NEYROLLES, O.; GUILHOT, C. Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. **Tuberculosis**, v. 91, p. 187-195, 2011.

82. NAIR, S.; PANDEY, A. D.; MUKHOPADHYAY, S. The PPE18 protein of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits NF- κ B/rel-mediated proinflammatory cytokine production by upregulating and phosphorylating suppressor of cytokine signaling 3 protein. **Journal of Immunology**, v. 186, p. 5413–5424, 2011.

83. OLSEN, A. W.; VAN PIXTEREN, L. A.; OKKLES, L. M.; RASMUSSEN, P. B.; ANDERSEN, P. Protection of mice with a tuberculosis vaccine based on a fusion protein of antigens 85b and esat-6. **Infection and Immunity**, v. 69: 2773, 2001.
84. OLSEN, A. W.; WILLIAMS, A.; OKKLES, L. M.; HATCH, G.; ANDERSEN, P. Protective effect of a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT-6 in the aerosol guinea pig model. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 6148-6150, 2004.
85. OTTENHOFF, T. H.; DOHERTY, T. M.; VAN DISSEL, J. T.; BANG, P.; LINGNAU, K. First in humans: a new molecularly defined vaccine shows excellent safety and strong induction of long-lived *Mycobacterium tuberculosis*-specific Th1-cell like responses. **Human Vaccines**, v. 6, p. 1007–1015, 2010.
86. OTTENHOF, T. H.; KAUFMANN, S. H. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? **PLos Pathogens**, v. 8, n. 5: e1002607, 2012.
87. PERSONNE, Y.; BROWN, A. C.; SCHUESSLER, D. L.; PARISH, T. *Mycobacterium tuberculosis* ClpP proteases are co-transcribed but exhibit different substrate specificities. **Plos One**, v. 8, n. 4: e60228, 2013.
88. PETERSON, P. K.; GEKKER, G.; HU, S.; SHENG, W. S.; ANDERSON, W. R.; ULEVITCH, R. J.; TOBIAS, P. S.; GUSTAFSON, K. V.; MOLITOR, T. W.; CHAO, C. C. CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by human microglia. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 1598-1602, 1995.
89. PITT, J. M.; BLANKLEY, S.; MCSHANE, H.; O'GARRA, A. Vaccination against tuberculosis: How can we better BCG? **Microbial Pathogenesis**, v. 58, p. 2-16, 2013.
90. PORANKIEWICZ, J.; WANG, J.; CLARKE, A. K. New insights into ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. **Molecular Microbiology**, v. 32, p. 449-458, 1999.
91. RABAHI, M. F.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; REIS, M. C. G.; OELEMANN, W.; CONDE, M. C. Humoral response to HspX and GlcB to previous and recent infection by *Mycobacterium tuberculosis*. **BMC Infectious Disease**, v. 7, p.148, 2007.
92. RAJU, R. M.; UNNIKRISHNAN, M.; RUBIN, D. H.; KRISHNAMOORTHY, V.; KANDROR, O. *Mycobacterium tuberculosis* CLpP1 and ClpP2 function together in protein degradation and are required for viability in vitro and during infection. **Plos Pathogens**, v. 8: e1002511, 2012.

93. RAMAKRISHNAN, L.; FEDERSPIEL, N.A.; FALKOW, S. Granuloma-specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family. **Science**, v. 288, p. 1436–1439, 2000.
94. RANDHAWA, A. K.; ZILTENER, H. J.; MERZABAN, J. S.; STOKES, R. W. CD43 is required for optimal growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and in mice. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 1805-1812, 2005.
95. RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRET, A. J. MEROPS: MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 32, (Database issue): D160-D164, 2004.
96. REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, p. 1597–1608, 2013.
97. REHREN, G.; WATERS, S.; FONTAN, P.; SMITH, I.; ZARRAGA, A. M. Differential gene expression between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 87, p. 347-359, 2007.
98. RIBEIRO-GUIMARAES, M. L.; PESSOLANI, M. C. Comparative genomics of mycobacterial proteases. **Microbial Pathogenesis**, v. 43, p.173-178, 2007.
99. RIZZI, C.; BIANCO, M. V.; BIANCO, F. C.; SORIA, M.; GRAVISACO, M. J.; MONTENEGRO, V.; VAGNONI, L.; GARBACCIO, S.; DELGADO, F.; LEAL, K. S.; CATALDI, A. A.; DELLAGOSTIN, O. A.; BIGI, F. Vaccination with a BCG strain overexpressing Ag85B protects cattle against *Mycobacterium bovis* challenge. **PLoS One**, v. 7, n. 12: e51396, 2012.
100. ROBERTS, G.D.; KONEMAN, E. W; KIM, Y. K. **Manual of clinical microbiology. Mycobacterium**. Washington DC. Book. p. 304-339, 1991.
101. ROWLAND, R.; MCSHANE, H. Tuberculosis vaccines in clinical trials. **Expert Review of Vaccines**, v. 10, p. 645-658, 2011.
102. RUSSEL, D. G.; BARRY, C. E.; FLYNN, J. L. Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us. **Science**, v. 14, n. 328, p. 852-856, 2010.
103. SAMPAIO, E. P.; MOREIRA, A. L.; SARNO, E. N.; MALTA, A. M.; KAPLAN, G. Prolonged treatment with recombinant interferon γ induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 175, p. 1729-1737, 1992.
104. SAUNDERS, B. M.; FRANK, A. A.; ORME, I. M.; COOPER, A. M. CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis. **Cell Immunology**, v. 216, p. 65-72, 2002.
105. SCHUÉ, M; MAURIN, D.; DHOUIB, R.; N'GOMA, J. C.; DELORME, V.; LAMBEAU, G.; CARRIERE, F.; CANAAN, S. Two cutinase-like proteins secreted

by *Mycobacterium tuberculosis* show very different lipolytic activities reflecting their physiological functions. **FASEB Journal**, v. 24, p. 1893-1903, 2010.

106. SERBINA, N. V.; LIU, C-C.; SCANGA, C. A.; FLYNN, J. L. CD8+ cytotoxic T lymphocytes from lungs of *Mycobacterium tuberculosis* infected mice Express perforin in vivo and lyse infected macrophages. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 353-363, 2000.

107. SESHADRI, C.; TURNER, M. T.; LEWINSOHN, D. M.; MOODY, D. B.; VAN RHIJN, I. Lipoproteins are major targets of the polyclonal human Tcell response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Immunology**, v.190, n.1, p. 278-284, 2013.

108. SHANAHAN, E. R.; PINTO, R.; TRICCAS, J. A.; BRITTON, W. J.; WEST, N. P. Cutinase-like protein-6 of *Mycobacterium tuberculosis* is recognized in tuberculosis patients and protects mice against pulmonary infection as a single and fusion protein vaccine. **Vaccine**, v. 28, p. 1341-1346, 2010.

109. SILVA, D. G.; COOPER, P. D.; PETROVSKY, N. Inulin-derived adjuvants efficiently promote both Th1 and Th2 immune responses. **Immunology and Cell Biology**, v. 82, p. 611-616, 2004.

110. SILVA, B. D. S.; SILVA, E. B.; NASCIMENTO, I. P.; REIS, M. C. G.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. MPT-51/CpG DNA vaccine protects mice against *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine**, v. 27, p. 4402-4407, 2009.

111. SKINNER, M. A.; BUDDLE, B. M.; WEDLOCK, D. N.; KEEN, D. L.; DE LISLE, G. W.; TASCAN, R. E.; FERRAZ, J. C.; LOWRIE, D. B.; COCKLE, P. J.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G. A DNA- *Mycobacterium bovis* BCG boost vaccination strategy in cattle induces protection against bovine tuberculosis. **Infection Immunity**, v. 71, p. 4901- 4907, 2003.

112. SKINNER, M. A.; WEDLOCK, D. N.; DE LISLE, G. W.; COOKE, M. M.; TASCAN, R. E.; FERRAZ, J. C.; LOWRIE, D. B.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G.; BUDDLE, B. M. The order of a prime-boost vaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG and a DNA vaccine encoding mycobacterial proteins Hsp65, Hsp70 and Apa is not critical for enhancing protection against bovine tuberculosis. **Infection Immunity**, v. 73, p. 4441–4444, 2005.

113. SOUSA, E. M.; DA COSTA, A. C.; TRENTINI, M. M.; DE ARAÚJO FILHO, J. A.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Immunogenicity of a fusion protein containing immunodominant epitopes of Ag85C, MPT51, and HspX from *Mycobacterium tuberculosis* in mice and active TB infection. **PLoS One**, v. 7, p. 1-11, 2012.

114. SPERTINI, S.; AUDRAN, R.; LURATI, F.; OFORI-ANYINAM, O.; ZYSSET, F.; VANDEPAPELIÈRE, P.; MORIS, P.; DEMOITIÉ, M. A.; METTENS, P.; VINALS, C.; VASTIAU, I.; JONGERT, E.; COHEN, J.; BALLOU, W. R. The

candidate tuberculosis vaccine Mtb72F/AS02 in PPD positive adults: A randomized controlled phase I/II study. **Tuberculosis**, v. 93, p. 179-188, 2013.

115. SPICER, T.; FERNANDEZ-VEGA, V.; CHASE, P.; SCAMPAVIA, L.; TO, J.; DALTON, J. P.; DA SILVA, F. L.; SKINNER-ADAMS, T. S.; GARDINER, D. L.; TRENHOLME, K. R.; BROWN, C. L.; GHOSH, P.; PORUBSKY, P.; WANG, J. L.; WHIPPLE, D. A.; SCHOENEM, F. J.; HODDER, P. Identification of potent and selective inhibitors of the Plasmodium falciparum M18 aspartyl aminopeptidase (PfM18AAPP) of human malaria via high-throughput screening. **Journal of Biomolecular Screening**, DOI: 10.1177/1087057114525852, 2014.

116. TAMURA, N.; LOTTSPREICH, F.; BAUMEISTER, W.; TAMURA, T. The Role of tricorn protease and its aminopeptidase-interacting factors in cellular protein degradation. **Cell**, v. 95, p. 637–648, 1998

117. TISCHLER, A. D.; MCKINNEY, J. D. Contrasting persistence strategies in Salmonella and Mycobacterium. *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, p. 93–99, 2010.

118. ULRICHS, T.; KAUFMANN, S. H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. **Journal of Pathology**, v. 208, p. 261–269, 2006.

119. UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A.; SMITH, K. F.; ADEREM, A. Toll-like receptor-2 mediates micobactéria-induced proinflammatory signaling in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 14459-14463, 1999.

120. VAN DISSEL, J. T.; AREND, S. M.; PRINS, C.; BANG, P., TINGSKOV, P. N. Ag85BESAT- 6 adjuvanted with IC31 promotes strong and long-lived Mycobacterium tuberculosis specific T cell responses in naive human volunteers. **Vaccine**, v. 28, p. 3571–3581, 2010.

121. VAN DISSEL, J. T.; SOONAWALA, D.; JOOSTEN, S. A.; PRINS, C.; AREND, S. M. Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31(R) promotes strong and long-lived Mycobacterium tuberculosis specific T cell responses in volunteers with previous BCG vaccination or tuberculosis infection. **Vaccine**, v. 29, p. 2100–2109, 2011.

122. VON ESCHEN, K.; MORRISON, R.; BRAUN, M.; OFORI-ANYINAM, O.; DE KOCH. E.; PAVITHRAN, P.; KOUTSOUKOS, M.; CAIN, D.; DUBOIS, M. C.; COHEN, J.; BALLOU, W. R. The candidate tuberculosis vaccine Mtb72F/AS02A. **Human Vaccines**, v. 5, n.7, p. 475-482, 2009.

123. VORDERMEIER, H. M.; COCKLE, P. J.; WHELAN, A. O.; RHODES, S.; CHAMBERS, M. A.; Effective DNA vaccination of cattle with the mycobacterial antigens MPB83 and MPB70 does not compromise the specificity of the comparative intradermal tuberculin skin test. **Vaccine**, v.19, p. 1246-1255, 2000.

124. WATERS, W. R.; PALMER, V.; NONNECKE, B. J. THACKER, T. C.; CAPINOS SCHERER, C. F.; ESTES, D. M.; HEWINSON, R. G.; VORDERMEIER, H. M.; BARNES, S. W.; FEDERE, G. C.; WALKER, J. R.; GLYNNE, R. J.; HSU, T.; WEINRICK, B.; BIERMANN, K.; LARSEN, M. H.; JACOBS JR, W. R. Efficacy and immunogenicity of *Mycobacterium bovis* Δ RD1 against aerosol *M. bovis* infection in neonatal calves. **Vaccine**, v. 27, p. 1201–1209, 2009.
125. WATERS, W. R.; PALMER, M. V., BUDDLE, B. M.; VORDERMEIER, H. M. Bovine tuberculosis vaccine research: historical perspectives and recent advances. **Vaccine**, v. 30, n. 16, p. 2611- 2622, 2012.
126. WEDLOCK, D. N.; SKINNER, M. A.; PARLANE, N. A.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G.; DE LISLE, G. W.; BUDDLE, B. M. Vaccination of cattle with DNA vaccines encoding the mycobacterial antigens MPB70 and MPB83: protein boosting induces antibody and does not enhance vaccine efficacy. **Tuberculosis**, v. 83, 339–349, 2003.
127. WEDLOCK, D. N.; ALDWELL, F. E.; DE LISLE, G. W.; VORDERMEIER, H. M.; HEWINSON, R. G.; BUDDLE, B. M. Protection against bovine tuberculosis induced by oral vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* BCG is not enhanced by coadministration of mycobacterial protein vaccines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.144, p. 220–227, 2011.
128. WIKER, H. G.; LYASHCHENKO, K. P.; AKSOY, A. M.; LIGHTBODY, K. A.; POLLOCK, J. M. Immunochemical characterization of the MPB70/80 and MPB83 proteins of *Mycobacterium bovis*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 1445-1452, 1998.
129. WILK, S.; WILK, E.; MAGNUSSON, R. P. Purification, characterization, and cloning of a cytosolic aspartyl aminopeptidase. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 273. N. 26, p. 15961-15970, 1998.
130. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Report 2012**: Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. Geneva. World Health Organization; 2012.
131. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Report 2014**: Global Tuberculosis Report. World Health Organization; 2014.
132. WORLD ORGANIZATION OF ANIMAL HEALTH. OIE-
<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2013/>
133. WRIGHT, J. W.; HARDING, J. W. Brain rennin-angiotensin- a new look at an old system. **Progress in Neurobiology**, v. 95, n.1, p. 49-67, 2011.
134. YOKOYAMA, R.; KAWASAKI, H.; HIRANO, H. Identification of yeast aspartyl aminopeptidase gene by purifying and characterizing its product from yeast cells. **FEBS Journal**, v.273, n. 1, p. 192-198, 2006.

CAPÍTULO 2- PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DAP E AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E PROTEÇÃO DA VACINA DE SUBUNIDADE PROTEICA DAPC EM MODELO MURINO DE INFECÇÃO.

RESUMO: A tuberculose (TB) é um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil, um dos países da América latina que apresenta os maiores números de casos da doença. A Organização Mundial da Saúde estima que um terço da população mundial esteja infectado com o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), o agente causador da TB. O Mtb produz várias proteínas que são fundamentais para o metabolismo e sobrevivência da bactéria durante a infecção. A enzima Rv0800 (DAP) é uma aspartil aminopeptidase pertencente à família M18 de metalo proteases e foi predita como sendo essencial para a sobrevivência *in vivo* e patogenicidade da bactéria. Contudo, pouco se sabe sobre a sua real função e se ela é realmente produzida pelo *M. tuberculosis*. Este estudo teve o objetivo de clonar o gene *pepC* codificador da proteína DAP para produção heteróloga da proteína em *E. coli*, confirmar a sua expressão pelo Mtb e avaliar o potencial da proteína recombinante como componente de vacina de subunidade proteica. A produção da proteína recombinante foi bem sucedida por meio da clonagem no vetor de expressão pET28a e transformação em *E. coli*. Sua expressão pelo Mtb foi confirmada por meio de western blot. A proteína recombinante foi usada como vacina de subunidade associada a um peptídeo antimicrobiano derivado da água de coco, o Cn-AMP1, que foi usado como adjuvante. A nova formulação, DAPC, foi avaliada como vacina em camundongos BALB/c e após as imunizações foi observada a indução de anticorpos das classes IgG1 e IgG2a quando a vacina foi usada sozinha ou combinada com a BCG, assim como linfócitos TCD4 e TCD8 produtores de IFN- γ específicos. Após o desafio tanto o baço como no pulmão, células TCD4⁺ e TCD8⁺ IFN- γ ⁺ foram detectados e os anticorpos permaneceram elevados. Entretanto, as lesões inflamatórias nos pulmões dos animais vacinados com a vacina DAPC sozinha ou com o Cn-AMP1 foram intensas e a carga bacilar neste órgão não foi reduzida. Apenas a vacina BCG conferiu proteção aos animais com poucas lesões nos pulmões.

Palavras-chave: tuberculose, saúde pública, enzima, imunogenicidade.

CHAPTER 2: PRODUCTION OF THE RECOMBINANT PROTEIN DAP AND EVALUATION OF THE IMMUNOGENICITY AND PROTECTION OF THE PROTEIN SUBUNIT VACCINE DAPC IN THE MURINE MODEL OF INFECTION.

ABSTRACT: Tuberculosis (TB) is a major public health problem in Brazil, one of the Latin America countries with the highest rate of disease cases. The World Health Organization estimates that one-third of the world population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the causative agent of TB. Mtb produces a number of proteins that have fundamental importance for the bacteria metabolism and survival during the infection. The Rv0800 (DAP) protein is an aspartyl-aminopeptidase that belongs to the metalloproteases family and was predicted as being essential for *in vivo* survival and pathogenicity of Mtb. However, little is known about its function and whether this enzyme is produced and secreted by the agent. This study aimed to produce the recombinant protein DAP in *E. coli*, assess the protein expression by Mtb and estimate the potential of the enzyme as a component for subunit protein vaccine. The protein gene was cloned in pET28a plasmid, transformed into *E. coli* and its expression was confirmed by western blot. The recombinant protein was used as a subunit vaccine associated with a antimicrobial peptide derived from coconut water, Cn-AMP1 that works as an adjuvant and the new formulation (DAPC) was evaluated as a vaccine in the BALB/c mice model. An induction of specific IgG1 and IgG2a antibodies and also specific CD4⁺ and CD8⁺ IFN- γ ⁺ lymphocytes in the spleens and lungs was observed after the immunizations when the DAPC vaccine was used alone or combined with BCG. After the challenge with Mtb the antibodies levels remained high and CD4⁺ and CD8⁺ IFN- γ ⁺ lymphocytes were detected. However, extensive inflammatory lesions in the pulmonary tissue of animals from groups DAPC and Cn-AMP1 were observed and there was no reduction in the bacterial load. Only the BCG vaccine conferred protection and showed less tissue damage.

Keywords: tuberculosis, public health, enzyme, immunogenicity.

1-INTRODUÇÃO

A tuberculose continua sendo a segunda doença infecciosa que mais causa mortes em todo o mundo, apesar dos esforços da ONU bem como da comunidade científica que buscam novas vacinas e tratamentos para a doença. A TB pulmonar em adultos é a principal forma da doença e a vacinação com a BCG não tem impacto sobre o controle da epidemia global. Logo, o desenvolvimento de novas vacinas mais eficazes é uma necessidade urgente (HANEKOM et al., 2008).

Atualmente diferentes abordagens têm sido utilizadas na produção de vacinas contra a TB que incluem vacinas BCG recombinantes, cepas atenuadas de Mtb, vacinas de DNA e proteínas recombinantes (KAUFMANN et al., 2010). Em relação às proteínas recombinantes, vacinas de subunidade produzidas a partir de antígenos imunogênicos do Mtb apresentam resultados promissores. Vacinas de subunidade proteica combinam especificidade, segurança e fácil produção, o que torna essa modalidade uma estratégia promissora na construção de vacinas contra a TB. Além disso, essas vacinas podem conter epítomos imunogênicos selecionados associados a componentes imunomoduladores que direcionam uma resposta imune apropriada (JUNQUEIRA-KIPNIS et al., 2014).

Nesse contexto, vacinas de subunidade proteica têm vantagens em termos de segurança quando usadas em indivíduos soropositivos, além de poderem ser utilizadas sozinhas ou como um reforço para a BCG (DEY et al, 2011). Somado a isso, vacinas de subunidade proteica aparentemente não são influenciadas por micobactérias ambientais, outra característica positiva deste tipo de vacina (BRANDT et al., 2002). Para as proteínas do *Mycobacterium tuberculosis* serem consideradas componentes de vacinas elas precisam estimular imunidade protetora em modelos experimentais de infecção, serem imunogênicas na maioria dos pacientes com doença ativa avaliados e não apresentarem reação cruzada com proteínas humanas (KAO et al., 2012).

Muitas vacinas de subunidade proteica estão em fase de testes clínicos como a M72F, HyVac4 e ID93. As três formulações são compostas por proteínas recombinantes do Mtb em associação a adjuvantes. Apesar de a M72F possuir

uma enzima do Mtb em sua formulação, a Mtb39a, e já estar em testes clínicos, não existem muitas vacinas contra TB compostas por enzimas da bactéria. Além disso, a escolha de moléculas adjuvantes é crucial no desenvolvimento dessa classe de vacinas.

O Cn-AMP1 é um peptídeo pequeno com apenas nove aminoácidos derivado da água de coco que apresenta atividade antibacteriana, antifúngica e imunoestimulatória (SILVA et al., 2012). Neste estudo de 2012 foi observado que ao cultivar uma linhagem celular originária de macrófagos murinos (RAW 264.7) com o Cn-AMP1, com ou sem o estímulo do LPS, o peptídeo induziu a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL12p70 pelas células RAW 264.7. Quando usada uma alta concentração do peptídeo, os autores observaram que a produção de óxido nítrico (NO) também aumentava. Por possuir características desejáveis, sendo um bom indutor de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*, o Cn-AMP1 foi escolhido para compor a formulação vacinal avaliada neste trabalho.

No presente estudo objetivou-se avaliar a capacidade imunogênica e protetora da formulação vacinal DAPC, composta pela enzima DAP e pelo peptídeo Cn-AMP1 no modelo de TB murina.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produção da proteína recombinante rDAP

2.1.1. Amplificação e clonagem do gene *pepC*

Para a realização das reações de PCR e clonagem foi extraído o DNA genômico do isolado H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, fornecido pelo LACEN-DF. A extração de DNA foi realizada conforme descrito por SAMBROOK et al. (1989). As bactérias foram incubadas por 20 minutos a temperatura de 100°C em meio de cultura líquido (7H9) para inativação das mesmas. Em seguida, transferiu-se o conteúdo para um tubo de poliestireno de 15 mL e centrifugou-se por três minutos, a 4°C a 2500xg. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 2 mL de Tris-EDTA pH 8,0. Foram acrescentados 2 mL de tampão de lise e 100 µL de proteinase K (10mg/ mL) e a suspensão foi incubada a 56°C por três horas. Após esse período ferveu-se a solução por 10 minutos para inativação da proteinase K, seguida de três minutos de centrifugação a 4°C a 2000xg. O sobrenadante foi distribuído em microtubos em alíquotas de 500 µL, os quais receberam o mesmo volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1). Os tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados por cinco minutos, a 4°C a 10000xg. A fase aquosa foi recuperada e adicionou-se 500 µL de clorofórmio álcool isoamílico (24: 1) em cada tubo. Após nova centrifugação, a fase aquosa foi recuperada e 2,5 volumes de etanol gelado e 0,3M de acetato de sódio foram adicionados, seguido de uma incubação *overnight* a -20°C.

Ao término da incubação os tubos foram centrifugados por 15 minutos, a 4°C a 13000xg. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70% gelado. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 5 minutos, a 4°C a 13000xg e o sobrenadante foi descartado. Após a secagem dos sedimentos os mesmos foram ressuspensionados em 100 µL de água Milli-Q e armazenados a -20°C até o momento do uso.

Os oligonucleotídeos iniciadores (Quadro 1) foram desenhados com base nas sequências disponíveis do gene *pepC* da cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, GeneID: CAB09111.1 (GenBank®). As sequências alvo das enzimas de restrição foram adicionadas nos oligonucleotídeos para posterior inserção do amplicon em vetores de expressão.

QUADRO 1: Oligonucleotídeos (IDT®) utilizados na PCR e clonagem posterior em plasmídeo de expressão e as respectivas sequências das enzimas de restrição (em negrito).

Oligonucleotídeos	Enzima
Forward: 5' – CCA TAT GGC AGC CAC GGC ACA CGG C – 3'	Nde I
Reverse: 5' – CGC GGA TCC CTA TGC CTC GGA TAG CTC – 3'	BamH I

As concentrações dos reagentes para o ensaio de PCR foram as descritas no quadro 2.

QUADRO 2: Reagentes utilizados na reação de PCR e suas respectivas concentrações finais.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO
Tampão da enzima*	1x
MgCl₂	1,5 mM
dNTP (mix)	25 mM
Primer pepC Forward (peT21 e peT28a)	20 pmoles
Primer pepC Reverse (peT 21)	20 pmoles
Primer pepC Reverse (peT28a)	20 pmoles
Enzima**	1,0 U

*10X Go Taq REaction Buffer - 7,5 mM MgCl₂ (Invitrogen®, Brasil); **Taq DNA Polymerase Recombinant ou pfx50 DNA Polymerase (Invitrogen®, Brasil)

A reação foi conduzida utilizando-se 1 µL do DNA extraído no volume final de 50 µL, seguindo as concentrações finais dos reagentes indicados no Quadro 2. O material foi amplificado em um termociclador automático (LABNET®). O número de ciclos, o tempo e as temperaturas utilizadas para cada reação estão descritos no Quadro 3.

QUADRO 3: Condições utilizadas para amplificar fragmentos do gene *pepC* de *Mtb*

Reação	Desnaturação inicial	30 ciclos			Extensão final
		Desnaturação	Anelamento	Extensão	
(1) T/t	94°C/ 3 min	94°C/ 45 seg	55°C/ 30 seg	72°C/ 1,5 min	72°C/ 7 min
(2) T/t	94°C/ 2 min	94°C/ 15 seg	55°C/ 30 seg	68°C/ 1,5 min	68°C/ 5 min

Uma reação de PCR foi realizada com a enzima Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen®) para avaliar a amplificação do gene *pepC* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores desenhados (Quadro 3, reação 1).

Para a posterior adição do fragmento de PCR correspondente ao gene *pepC* da proteína Rv0800 em um plasmídeo de clonagem, foi realizada uma PCR (Quadro 3, reação 2) com uma enzima DNA polimerase de alta fidelidade, a Pfx50™ (*Thermococcus zilligii*) (Invitrogen®), com o intuito de evitar possíveis mutações no processo de amplificação.

O *amplicon* gerado pela reação de PCR foi então inserido no vetor de clonagem pCR 2.1 TOPO (Invitrogen®). O fragmento de PCR foi incubado por 10 minutos a 72°C com 1 µL de Taq DNA polimerase recombinante. Essa reação foi necessária pois a Pfx50 DNA polimerase não deixa extremidades com adenina no *amplicon* como a Taq recombinante, que são necessárias para a clonagem no vetor pCR 2.1 que possui extremidades com timina. Após essa reação o DNA foi purificado, de acordo com as instruções do kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare®), para se retirar componentes indesejáveis da reação de PCR que poderiam interferir nas etapas seguintes.

Para a reação de ligação foram utilizados 2 µL do vetor pCR 2.1, 2 µL do DNA purificado, 1 µL da T4 DNA ligase (Invitrogen®), 2 µL do tampão da enzima (Invitrogen®) e 3 µL de água destilada. A reação ocorreu por 16 horas a 14°C no termociclador (LABNET®).

As reações de PCR assim como as de ligação foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (50µg/100mL). A visualização dos fragmentos foi realizada por meio de transiluminação do gel em luz ultravioleta. O tamanho dos amplicons foi determinado pela comparação com um marcador de peso molecular de 1000

pares de base (Invitrogen®). Os géis foram fotografados utilizando o aparelho fotodocumentador modelo UNIVERSAL HOOD II (BIO-RAD®).

2.1.1.1. Transformação de bactérias com o plasmídeo recombinante pCR 2.1/*pepC*.

Bactérias *E. coli* (DH5 α) foram transformadas por choque térmico. Uma alíquota de células competentes foi descongelada e mantida em gelo. Adicionaram-se 5 μ L do plasmídeo recombinante pCR 2.1/*pepC* ao tubo de *E. coli*, seguido por incubação em gelo por 30 minutos. Após esse período o tubo foi colocado em banho-maria a 42°C por 90 segundos e, imediatamente transferido para o gelo por mais 2 minutos. Foram adicionados 800 μ L de meio SOC (triptona, extrato de levedura, NaCl e glicose) pré-aquecido e a solução foi incubada a 37°C por uma hora. Após centrifugação por 30 segundos a 2000xg, o sedimento foi ressuscitado em 100 μ L de meio SOC e plaqueado em meio LB ágar (triptona, extrato de levedura, NaCl e ágar) contendo 50 μ g/mL de ampicilina, 200 μ M de IPTG (tiogalactopiranosídeo de isopropila) e 40 μ g/ mL de Xgal. As placas foram incubadas *overnight* em estufa bacteriológica a 37°C.

Para posterior extração plasmidial, os clones positivos foram selecionados por α -complementação. As colônias brancas foram escolhidas para a extração do plasmídeo, pois continham o inserto desejado. A clonagem foi confirmada por meio de digestão com as enzimas de restrição *BamH* I (Invitrogen®) e *Nde* I (Invitrogen®). Para a realização da digestão, previamente foi feita a preparação plasmidial por lise alcalina com SDS de acordo com as instruções do fabricante (*Miniprep*- Invitrogen®).

Todas as etapas descritas anteriormente foram realizadas na UNB pelo Dr André Correia, sob a orientação do Professor Dr. Jaime Santana. As etapas a seguir foram realizadas nos laboratórios de Imunopatologia das Doenças Infecciosas e Bacteriologia Molecular do IPTSP, UFG.

Utilizando 5 μ L da *Miniprep*, foi então realizada a digestão com 0,5 μ L de cada enzima de restrição (*BamH* I e *Nde* I), 1 μ L do tampão (*Reaction Buffer*- Invitrogen®) e 3 μ L de água Milli-Q. A reação foi incubada *overnight* a 37°C e para

confirmação da clonagem foram aplicados 2 µL da digestão em gel de agarose a 0,8% para visualização dos fragmentos.

Foi selecionado um clone positivo para ser cultivado em 100 mL de meio LB com 50 µg/mL de ampicilina, com o intuito de extrair (*Midiprep*-Invitrogen®) DNA plasmidial para as etapas seguintes da clonagem, de acordo com as instruções do fabricante.

2.1.1.2. Digestão e purificação da sequência codificadora da enzima e do vetor de expressão pET28a.

Para a inserção da sequência codificadora da enzima DAP no plasmídeo de expressão pET28a, 30 µL da *Midiprep* assim como 30 µL do pET28a foram digeridos com 3 µL de cada uma das enzimas de restrição, *Bam*H I e *Nde* I, acrescidos de 4 uL de tampão. A reação foi incubada overnight a 37°C e para confirmação, 2 µL de cada digestão foi aplicado em um gel de agarose a 0,8%. O restante da reação de digestão foi aplicado em gel de agarose e os fragmentos correspondentes ao gene *pepC* e ao plasmídeo pET28a foram cortados, pesados e eluídos em H₂O Milli-Q a 37°C, de acordo com as instruções do fabricante do kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*.

2.1.1.3. Ligação da sequência codificadora da enzima no vetor pET28a, transformação e expressão da proteína recombinante.

Os fragmentos purificados do gel de agarose foram utilizados para a reação de ligação. Foram utilizados 2 µL do inserto, 2 µL do vetor pET28a, 1 µL da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen®), 2 µL do tampão da enzima e 3 µL de água destilada. A reação ocorreu por 16 horas a 14°C no termociclador (LABNET®).

A transformação foi realizada em bactérias *E. coli* BL21 (DE3) pLysS que apresentam a T7 RNA polimerase, pois o promotor do plasmídeo pET28a é do tipo T7 lac. Foram utilizados 50 µL de *E. coli* e 1 µL do plasmídeo recombinante pET28a/*pepC*.

As bactérias foram descongeladas e mantidas em gelo juntamente com as cubetas de eletroporação (BIO-RAD®). Um microtubo contendo 50 µL de *E. coli* e 3 µL do plasmídeo recombinante de expressão foi mantido em gelo por 10 minutos. A solução foi transferida para a cubeta e um choque de 4,5 milisegundos foi realizado no equipamento de eletroporação MICROPULSER (BIO-RAD®). Completou-se o volume para 1 mL com meio SOC que foi transferido para um tubo de rosca e incubado por uma hora a 37°C em baixa agitação. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 2000xg por um minuto, o sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspendidas foram plaqueadas em meio LB ágar com ampicilina e canamicina (50 µg/mL), sendo incubado a 37°C por 24 horas. Ao término do período, as colônias foram coletadas e cultivadas individualmente em tubos de rosca contendo meio LB caldo com ampicilina e canamicina (50 µg/mL), ficando sob agitação a 37°C por 24 horas. Após a incubação os clones foram distribuídos em microtubos em alíquotas de 1 mL e mantidos a -20°C até o momento do uso.

Foi produzido um pré-inóculo contendo 100 µL de um dos clones em 10 mL de meio LB com 50 µg/mL de canamicina. A cultura foi mantida a 37°C sob agitação por sete horas até atingir uma OD⁶⁰⁰ próxima de 0,6. Após esse período, o volume foi transferido para um tubo contendo 800 mL de meio LB sendo cultivado por mais quatro horas. Para a indução da expressão da proteína recombinante 0,5 mM de IPTG foi adicionado e o cultivo permaneceu sob agitação a 37°C por quatro horas. A suspensão bacteriana foi centrifugada em tubos de poliestireno de 50 mL a 3000xg por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi utilizado para a purificação da proteína. O esquema representativo das clonagens está apresentado na Figura 4.

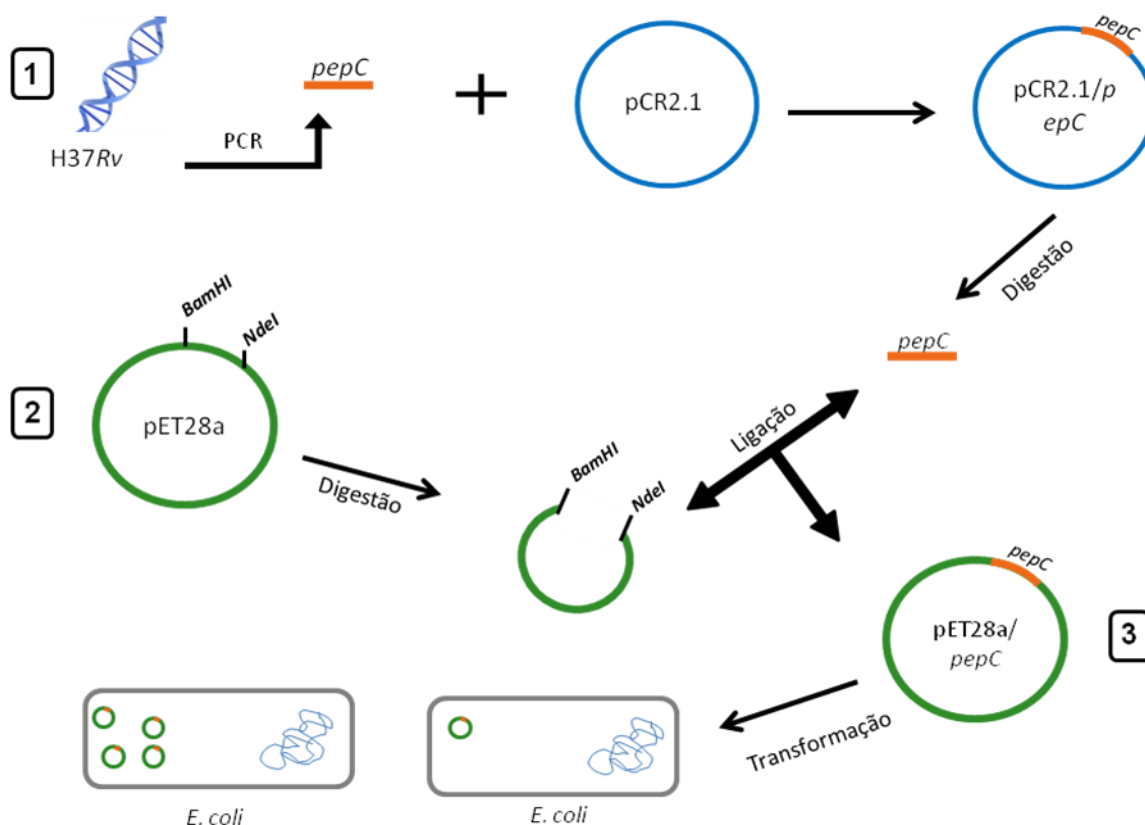


FIGURA 4: Esquema representativo das clonagens nos vetores pCR2.1 e pET28a. Amplificação do fragmento correspondente ao gene *pepC* a partir do DNA genômico da cepa *H37Rv* de *Mtb*, e posterior inserção no vetor de clonagem pCR2.1 (1); após a reação de digestão do vetor pCR2.1 para a liberação do inserto *pepC*, o mesmo foi ligado no vetor de expressão pET28a previamente digerido com as enzimas de restrição *BamH I* e *Nde I* (2); vetores de expressão contendo o inserto *pepC* foram utilizados para a transformação de bactérias *E. coli* BL21(DE3) pLysS por eletroparação para a produção da proteína recombinante em larga escala (3).

2.1.2. Purificação da proteína recombinante rDAP

O sedimento resultante da centrifugação da cultura de *E. coli* recombinante foi purificado em condição desnaturante, com base na presença de His-tag no N-terminal por meio da aplicação em coluna de afinidade ao níquel (Ni-NTA Fast Start Kit) (QUIAGEN®). O sedimento celular foi sonicado (SONOPULS-BANDELIN®) em 1 mL de *Binding Buffer* (PBS pH 7,3; imidazol 5mM) sem uréia em três pulsos de um minuto com intervalos de 30 segundos, no gelo. Em seguida,

foi realizada uma centrifugação a 20000 x g por 10 minutos a 4°C e o sedimento foi ressuspenso em 6 mL de *Binding Buffer* acrescido de uréia (6M). A solução ficou sob agitação por uma hora para solubilizar e foi centrifugada novamente. O sobrenadante foi recuperado para ser aplicado na coluna de purificação.

A coluna foi preparada de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizado 1 mL da solução de resina (estocada em etanol 20%) para ser aplicado na coluna e se obter 500 µL da mesma após a saída de todo o etanol por gravidade. Seguiram-se as etapas de lavagem com três volumes de água Milli-Q, carregamento da coluna com cinco volumes de *Charger Buffer* 1X (NiSO₄ 400mM), e mais uma lavagem com *Binding Buffer* 1X com uréia (6M). Após o carregamento e equilíbrio da coluna foi aplicado 1 mL do sobrenadante. A porção não ligada foi coletada seguida de uma lavagem com 10 volumes de *Binding Buffer* 1X com uréia (6M), onde foram coletados 5 mL. Após essa etapa, a coluna foi lavada com diferentes concentrações de imidazol com 6M de uréia para verificar em qual concentração de imidazol a proteína ficaria mais pura. A cada lavagem com imidazol (20mM, 40mM, 60 mM, 80mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM e 800 mM), foi coletado 1 mL para posteriormente ser aplicado em um gel de SDS.

Definidas as concentrações de imidazol (40mM e 400mM), a coluna foi novamente preparada e toda a proteína foi aplicada para ser purificada. Em seguida foram feitas lavagens sucessivas com 10 volumes de *Binding Buffer* com uréia, 10 volumes de imidazol (40mM) com uréia e uma última lavagem com quatro volumes de imidazol (400mM) com uréia, onde foram coletados 2 mL de solução purificada.

Após a purificação a proteína foi concentrada no Centricom (MILLIPORE®). Seguidas centrifugações (3000xg por três minutos a 4°C) com 1 mL de proteína e 1 mL de água Milli-Q foram realizadas até a obtenção de um 1 mL de proteína concentrada. Ao final do processo, a proteína foi quantificada por meio de SDS-PAGE e no equipamento Nanodrop Nano 2000 (THERMO SCIENTIFIC®).

2.1.3. Animais

Para a realização de todos os experimentos foram utilizados 45 camundongos BALB/c fêmeas, com idade entre seis a oito semanas provenientes do Biotério de criação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Os animais foram mantidos em micro isoladores acoplados à rack ventilada contendo filtros HEPA para entrada e saída de ar, com água e dieta *ad libitum*. A temperatura ambiente foi mantida entre 20-24°C, com umidade relativa entre 40-70% com ciclos de claro/escuro de 12h.

Todos os animais foram mantidos de acordo com as orientações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA). O protocolo para este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (Número de Protocolo: 079/12).

2.1.4. Produção de soro anti-DAP em camundongos

Para a produção do soro anti-DAP, foi utilizada a fração da proteína eluída com 400 mM de imidazol de acordo com o protocolo a seguir. Três camundongos BALB/c fêmeas foram separados para esta etapa e, antes do início das imunizações com a proteína recombinante, foi coletado sangue dos animais pelo plexo venoso retro-orbital com o auxílio de pipetas Pasteur de vidro, para obtenção de soro controle.

Passados 14 dias da coleta de sangue, os animais foram imunizados por via subcutânea com 100 µL de solução contendo 5 µg de DAP purificada diluída em PBS estéril e 50% de adjuvante completo de Freund (FCA). Após 14 dias da primeira imunização, foi realizado um reforço com 100 µL de solução contendo 5 µg de DAP purificada diluída em PBS e 50% de adjuvante incompleto de Freund (FIA).

Após 14 dias do reforço, foi coletado sangue do plexo venoso retro-orbital dos animais para obtenção de soro anti-DAP. Após 35 dias da primeira imunização foi realizado um segundo reforço. Dez dias após o segundo reforço foi

coletado sangue dos animais para obtenção de soro anti-DAP. Ao final do procedimento, os animais foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical.

2.1.5. Western Blot

Para identificar a presença da proteína DAP na cultura de *M. tuberculosis* H37Rv, foi feito um Western blot. O sobrenadante da cultura de H37Rv e o lisado celular foram preparados a partir de bactérias cultivadas em meio Sauton. O cultivo foi feito em 200 mL de meio até que fosse atingida a fase log. Em seguida a cultura foi centrifugada a 2000xg durante 20 min. O sedimento foi ressuspenso em PBS e sonificado para que as células bacterianas fossem lisadas. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e foi filtrado em membrana de 0.2 µm. O concentrado proteico filtrado foi solubilizado em tampão de amostra para SDS-PAGE e aplicado em um gel de poliacrilamida e duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12%. Após a separação eletroforética, foi realizada a transferência para a membrana de nitrocelulose e os filtros foram embebidos por 15 minutos no tampão de transferência (Tris, glicina, metanol e SDS 10%). A transferência se deu por uma hora a 100V, 350mA e 50W no equipamento POWER PAC™ BASIC (BIORAD®). A membrana foi então bloqueada com PBS leite 5%, e incubada por duas horas a 37°C com soro anti-DAP, diluído a 1:500 em PBS leite 1%. Em seguida foi lavada com PBS e incubada por uma hora a 37°C com anticorpo secundário anti-IgG total de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), diluído a 1:2500 em PBS leite 1%. O complexo antígeno-anticorpo foi detectado pela adição do sistema de substrato líquido BCIP/NBT (Sigma-Aldrich) ao abrigo da luz, até o momento em que as bandas foram reveladas.

3. Peptídeo Cn-AMP1

O peptídeo Cn-AMP1 foi gentilmente cedido pelo Dr Luiz Otávio Franco (Universidade Católica de Brasília). O Cn-AMP1 foi sintetizado com pureza superior a 95% por China Peptides (Shangai, China) (CHAN et al., 2000). A sequência correspondente ao peptídeo é N-SVRAGRAQGM-C.

4. Análise imunogênica da proteína recombinante.

4.1. Delineamento experimental

Os camundongos foram agrupados ao acaso em seis grupos de sete animais, que foram mantidos em duas gaiolas, uma contendo quatro animais e outra contendo três animais. Cada grupo recebeu o seguinte esquema de vacinação:

- Grupo 1 (Controle Negativo-PBS): camundongos injetados três vezes com 100 µL de PBS estéril, por via subcutânea (SC) com intervalo de 15 dias entre cada imunização;
- Grupo 2 (BCG): camundongos imunizados uma vez com 10^6 UFC de *M. bovis* BCG por via subcutânea (SC).
- Grupo 3 (BCG + DAPC): camundongos imunizados uma vez com 10^6 UFC de *M. bovis* BCG e um mês depois, imunizados três vezes com 20 µg/mL da vacina de subunidade protéica DAPC composta pela proteína recombinante rDAP associada ao adjuvante peptídico Cn-AMP1, por via subcutânea (SC) com intervalo de 15 dias entre cada imunização;
- Grupo 4 (DAPC): camundongos imunizados três vezes com 20 µg/mL da vacina de subunidade protéica composta pela proteína recombinante rDAP associada ao adjuvante peptídico Cn-AMP1, por via subcutânea (SC) com intervalo de 15 dias entre cada imunização;

- Grupo 5 (Cn-AMP1): camundongos injetados três vezes com 20 µg/mL do adjuvante peptídico Cn-AMP1 por via subcutânea (SC) com intervalo de 15 dias entre cada imunização;
- Grupo 6 (Controle Infecção): camundongos injetados três vezes com 100 µL de PBS estéril, por via subcutânea (SC) com intervalo de 15 dias entre cada imunização e desafiados 60 dias após a última imunização.

Três animais dos grupos 1 ao 5 foram eutanasiados 30 dias após a última imunização para a análise da imunogenicidade induzida pela vacinação. O restante dos animais dos grupos 2 ao 6 foram infectados com Mtb 60 dias após a última imunização. 30 dias após a infecção, todos os animais do esquema vacinal foram eutanasiados para análise da resposta imune induzida e eficácia protetora da vacina (Figura 5).

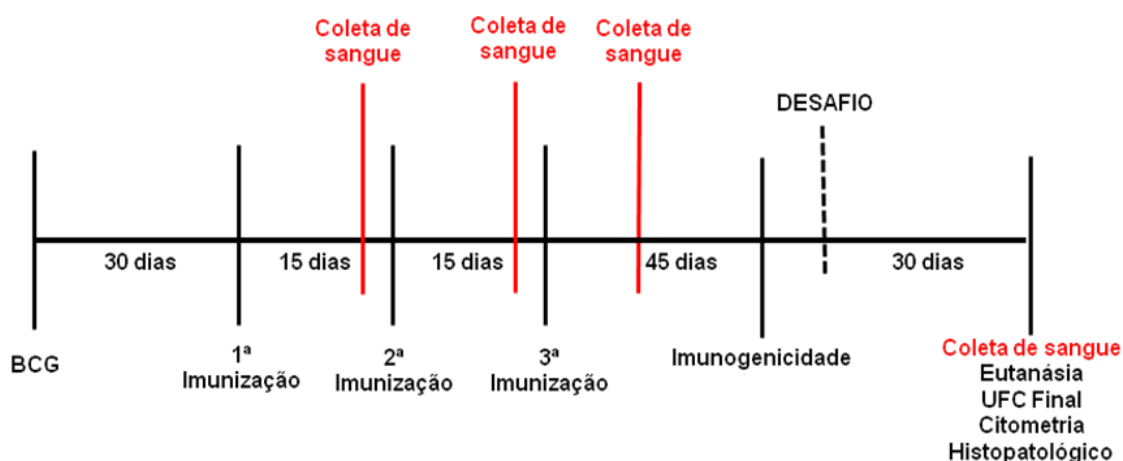


FIGURA 5: Esquema vacinal do estudo com as respectivas imunizações e pontos experimentais.

4.2. Infecção endovenosa com *Mycobacterium tuberculosis*

A cepa de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) fornecida pela Universidade do Estado do Colorado (Colorado State University, Fort Collins, Colorado, Estados Unidos) foi cultivada em meio 7H9 suplementado com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), contendo Tween 80 a 0,05% até a fase log de crescimento bacteriano, depois foram aliquotadas e mantidas em

freezer a -80°C . O estoque foi plaqueado e quantificado um mês após o congelamento. Diluições centesimais do estoque foram plaqueadas em meio 7H11 suplementado com OADC e as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas. No dia da infecção, o inóculo foi diluído em PBS Tween 80 a 0,05% na concentração de 10^6 UFC/ mL e 100 μL do inóculo foi administrado por via endovenosa (via plexo retro-orbital), sendo inoculado, portanto 10^5 UFC/ animal. Como controle, o inóculo foi plaqueado em meio 7H11 suplementado com OADC.

4.2.1. Determinação da carga bacteriana.

Um dia após a infecção, um camundongo de cada grupo foi eutanasiado e o pulmão foi removido e homogeneizado em PBS Tween 80 a 0,05%. O homogenato foi plaqueado em meio 7H11 suplementado com OADC, para confirmar a dose de infecção utilizada.

Passados 30 dias da infecção, a carga bacteriana foi determinada pelo plaqueamento do homogenato do lobo superior e médio do pulmão de três animais de cada grupo em meio 7H11 suplementado com OADC. As colônias foram quantificadas após 21 dias de incubação em estufa de CO_2 a 5% a 37°C .

4.3. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Foi coletado sangue dos camundongos para a obtenção de soro e realização da técnica de ELISA para a detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos contra rDAP. As imunizações foram realizadas com intervalos de 15 dias e um dia antes de cada vacinação foi coletado o sangue dos animais. Placas de poliestireno de 96 orifícios (Ultra Cruz) foram adsorvidas com 50 μL /poço de rDAP (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluída em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M (pH 9,6) e incubadas por 18 h a 4°C . Após este período, as placas foram bloqueadas por duas h a 37°C com 100 μL /poço de tampão carbonato/bicarbonato de sódio contendo gelatina a 0,5%. As amostras de soros foram diluídas a 1:200 e 1:400 e

adicionadas nos orifícios (50 µL/poço), com posterior incubação por duas h a 37°C. Em seguida as placas foram lavadas seis vezes com PBS Tween 20 a 0,05%, com intervalos de cinco minutos entre as lavagens. Os anticorpos conjugados a biotina (anti-mouse IgG1 e IgG2a Pharmingen) foram diluídos a 1:5000 em PBS contendo gelatina 0,05% (PBSg) e 50 µL da solução foi adicionada em cada orifício das placas. Após a incubação por uma hora a 37°C, as placas foram lavadas seis vezes com PBS Tween 20 0,05%. A estreptoavidina-peroxidase (BD Biosciences) foi diluída em PBSg a 1:10000 e 50 µL dessa solução foi adicionada em cada poço com posterior incubação por uma hora a 37°C. Após a incubação foram realizadas mais seis lavagens antes da revelação. A reação foi revelada com a adição de 50 µL/poço de tampão citrato-fosfato pH 4,5 contendo OPD (ortho-phenylenediamine-Merck) e água oxigenada a 20V. A reação enzimática foi finalizada com a adição de 50 µL/ poço de ácido sulfúrico 4N. As placas foram lidas a 492 nm na leitora de ELISA (Labsystems Multiskan Thermo).

4.4. Obtenção das células do baço

Aos 60 dias após a última imunização e aos 30 dias após a infecção, a eutanásia dos camundongos foi feita por deslocamento cervical, seguida de análise macroscópica dos órgãos, e coleta do baço, que foi mantido em tubos de poliestireno contendo meio RPMI (RPMI médium 1640 GIBCO) gelado até o momento do seu processamento. Em uma capela de fluxo laminar o baço foi processado em um filtro de 70 µm para células (BD Biosciences, Lincoln Park, NJ). Os esplenócitos foram ressuspensos em meio RPMI e os eritrócitos lisados com solução de lise (0,15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃). As células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI complementado (cRPMI) com 10% de soro bovino fetal, 0,15% de bicarbonato de sódio, 1% de L-glutamina (200 mM SIGMA), 1% de penicilina-estreptomicina (200 mM SIGMA), 1% de piruvato de sódio (SIGMA), 1% de aminoácidos não essenciais 100X (SIGMA). Posteriormente, as células foram contadas utilizando a câmara de Neubauer e ajustadas para 1x10⁶/mL.

4.5. Obtenção das células do pulmão

As células dos lóbulos acessório e direito do pulmão foram digeridas como descrito anteriormente por JUNQUEIRA-KIPNIS et al. (2003). Ao acessar a cavidade torácica do camundongo injetou-se no ventrículo direito 5 mL de solução gelada contendo PBS e 45 U/mL de Heparina (Sigma-Aldrich®) para a retirada do sangue dos vasos pulmonares e posterior coleta do pulmão. Após a coleta em tubos de poliestireno contendo meio RPMI gelado o pulmão foi tratado com uma solução de DNase IV (30 µg/mL; Sigma- Aldrich®) e Collagenase III (0,7 mg/mL; Sigma-Aldrich®) por uma hora a 37°C. Para a obtenção das células o homogenato foi passado em filtro de 70 µm. Os eritrócitos foram lisados com solução de lise e, em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em meio cRPMI. Posteriormente, as células foram contadas e ajustadas para 1×10^6 /mL.

4.6. Avaliação celular e de citocinas do baço e pulmão

As suspensões celulares de baço e pulmão foram distribuídas em suas respectivas placas de cultura de 96 orifícios (Corning®). As células de cada animal foram cultivadas sem estímulo (apenas com meio RPMI) ou estimuladas com Concanavalina A-ConA (10 µg/mL) em um dos orifícios e em outro com o antígeno rDAP (10 µg/mL). As células foram incubadas em estufa de CO₂ a 5% a 37°C por quatro horas. Após este período, foi acrescentado monensina (eBioscience®) na concentração de 3 mM e as culturas foram submetidas a nova incubação por seis horas. Para a marcação extracelular as células foram incubadas com os anticorpos anti PercP-CD4 (BD PharMingen®) e anti PE-CD8 (eBioscience®) diluídos em PBS azida 0,05% por 30 minutos a 4°C e fixadas com *Perm fix* (BD Pharmingen®) durante 20 minutos a 4°C.

Em seguida, para a marcação intracelular as células foram permeabilizadas com *Perm wash* (BD Pharmingen®) durante 10 minutos a 4°C e o anticorpo anti APC-IFN-γ (eBioscience®) diluído em *Perm wash* foi adicionado por 30 minutos a 4°C. Ao final da marcação as culturas foram centrifugadas por 15

minutos a 10°C a 1500 rpm com 200 µL de *Perm wash* por poço e o sobrenadante foi desprezado por inversão. As células foram ressuspensas em PBS azida sódica 0,05% por poço e mantidas ao abrigo da luz a 4°C até o momento da aquisição.

Todas as análises foram realizadas com aquisição de 50.000 eventos no Citometro de Fluxo BD Biosciences FACSCalibur (Hospital Araújo Jorge-Goiânia) e os dados foram analisados no software FlowJo. Os linfócitos foram selecionados baseando-se nas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC).

4.7. Histopatológico

Trinta dias após a infecção endovenosa, o lóbulo pulmonar inferior direito de cada animal foi fixado com formol a 10% tamponado com PBS. Os tecidos foram processados em histotécnico automático, incluídos em parafina e seccionados em micrótomo (Leica RM2165). Obteve-se de cada bloco cortes consecutivos de 5 µm que foram colocados sobre lâminas histológicas e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE) para análise em microscopia óptica (Axio scope.A1_ Carl Zeiss), utilizando o programa AxioVision 4.7. Os eventos microscópicos avaliados nestes cortes histológicos foram: intensidade de infiltrados inflamatórios, presença ou não de macrófagos espumosos e áreas de necrose. O escore das lesões foi feito usando o software ImageJ versão 1.48. Para a determinação do escore foi feita a razão entre a soma das áreas de lesão e o tamanho total do corte histológico de cada pulmão.

4.8. Imunoistoquímica associada à coloração álcool-ácido

Para detecção de TNF- α nos pulmões dos camundongos foi utilizada a reação de imunohistoquímica de acordo com o descrito a seguir. Os cortes histológicos de pulmão parafinizados foram preparados e passaram pelo processo de hidratação. Foram mergulhados em HistoClear (National Diagnostic) por quatro

minutos duas vezes. Em seguida as lâminas passaram por lavagens sucessivas em etanol 100%, 100%, 96%, 70% e 50%, permanecendo submersas por quatro minutos. Finalizando o processo de hidratação, os cortes permaneceram por quatro minutos em água destilada e quatro minutos em PBS.

O bloqueio foi realizado com a peroxidase (Bio Rad) diluída no diluente da enzima na proporção 1:10. Cada lâmina recebeu volume suficiente para cobrir o tecido pulmonar e permaneceram em repouso por quatro minutos. As lâminas foram então colocadas em um recipiente contendo o tampão de recuperação 1X (Dako). O recipiente foi colocado na panela de pressão (Retriever 2100) e permaneceu por 30 minutos a 100°C. Após esse período as lâminas foram retiradas da panela e permaneceram no recipiente por 20 minutos até que esfriassem. Foram lavadas em PBS e permeabilizadas por 20 minutos com solução de permeabilização (saponina 0,1%). Após essa etapa os cortes histológicos foram incubados por quatro minutos em câmara úmida a temperatura ambiente com a solução proteica de bloqueio (BACKGROUND SNIPPER, Biomedical Care).

Para a detecção do TNF- α , o excesso de solução foi retirada e as lâminas incubadas com anticorpo primário (IgG de cabra anti TNF- α , Santa Cruz) diluído em PBS a 1:50. As lâminas foram incubadas *overnight* em câmara úmida. Finalizado esse período os tecidos foram lavados três vezes em PBS por cinco minutos. A incubação com o anticorpo secundário (anti IgG de cabra conjugado com a peroxidase, Santa Cruz) foi feita na diluição 1:200 deixando o mesmo em contato com o tecido por uma hora em câmara úmida. Mais uma sequência de três lavagens com PBS foi realizada por cinco minutos cada.

Para revelar a reação foi utilizado o kit da peroxidase Impact DAB (Vector). O tecido foi coberto por completo e foi incubado durante oito a 10 minutos. Após esse período as lâminas foram lavadas em água por cinco minutos. Em seguida, os cortes receberam a coloração vermelha do kit, a fucsina (BD) por 30 minutos. Finalizada essa incubação as lâminas foram cuidadosamente lavadas com álcool ácido e em seguida coradas com hematoxilina por um minuto. Os cortes foram lavados com água corrente e após a secagem as lâminas foram montadas com auxílio da solução aquosa de montagem (Vector).

4.9. Análise estatística

Os resultados apresentados neste trabalho foram tabulados no Prism 5 software (Graphpad Software 5.0), expressos como média $\pm$ desvio padrão (SD). A comparação entre os grupos foi dada pela análise de variância (ANOVA). Análise estatística múltipla (ANOVA one way, seguido de teste de Bonferroni) foi utilizada para avaliar as possíveis diferenças entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5-RESULTADOS

5.1. Produção da proteína recombinante rDAP

5.1.1. Confirmação da amplificação do gene *pepC* da proteína aspartil aminopeptidase (DAP) de *Mycobacterium tuberculosis*.

Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados e sintetizados foram primeiramente testados usando-se uma PCR com a enzima Taq DNA polimerase. Para amplificação do gene alvo, uma nova PCR foi realizada com a enzima de alta fidelidade Pfx50 DNA polimerase, para evitar possíveis mutações na amplificação do fragmento esperado. Assim, foi amplificado de forma bem sucedida o fragmento esperado de 1302 pares de base (pb) correspondente ao gene *pepC* da enzima DAP de *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 6).

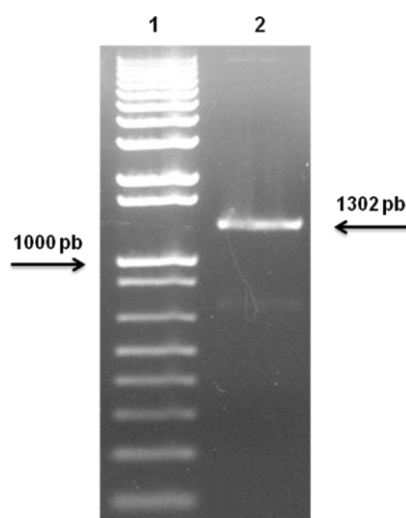


FIGURA 6: PCR convencional com Pfx50 DNA polimerase. Amplificação do gene *pepC* da enzima DAP de *Mycobacterium tuberculosis*. 1: MM- massa molecular. 2: fragmento de 1302 pb correspondente ao gene *pepC*.

5.1.2. Expressão e purificação da proteína recombinante.

Após a correta amplificação do gene *pepC*, o fragmento purificado foi então ligado ao plasmídeo de clonagem pCR 2.1. Bactérias *E. coli* (XL1-Blue) competentes foram transformadas com o vetor recombinante pCR 2.1/*pepC* e a clonagem foi confirmada por meio de uma reação de digestão com as enzimas de restrição *BamH* I e *Nde* I (Figura 7).

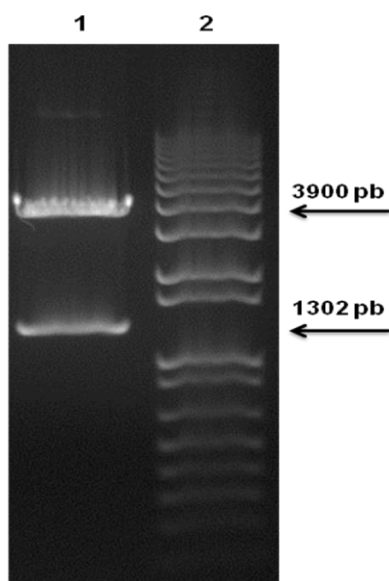


FIGURA 7: Confirmação da inserção do gene *pepC* no vetor de clonagem pCR 2.1 por meio da reação de digestão. 1: digestão do vetor recombinante pCR 2.1/*pepC*, liberando o inserto de 1302 pb; 2: marcador de massa molecular.

Um dos clones positivos foi selecionado para que o gene *pepC* fosse retirado. Para tanto uma cultura de *E. coli* contendo o plasmídeo recombinante pCR 2.1/*pepC* foi cultivada em larga escala, o plasmídeo foi purificado, digerido com as enzimas *BamH* I e *Nde* I, e o inserto liberado foi purificado por meio de eluição em gel de agarose.

O fragmento correspondente ao gene *pepC* digerido e eluído foi ligado ao vetor pET28a e a ligação foi usada para transformação de bactérias *E. coli* XL1-blue competentes, e a confirmação da clonagem foi feita pela digestão com as enzimas *BamH* I e *Nde* I (Figura 8A). Um clone positivo, ou seja, que continha o inserto foi utilizado para transformação em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS e expressão da proteína recombinante, rDAP.

O clone que expressou maiores quantidades de DAP foi cultivado em larga escala para a purificação da proteína recombinante (Figura 8B).

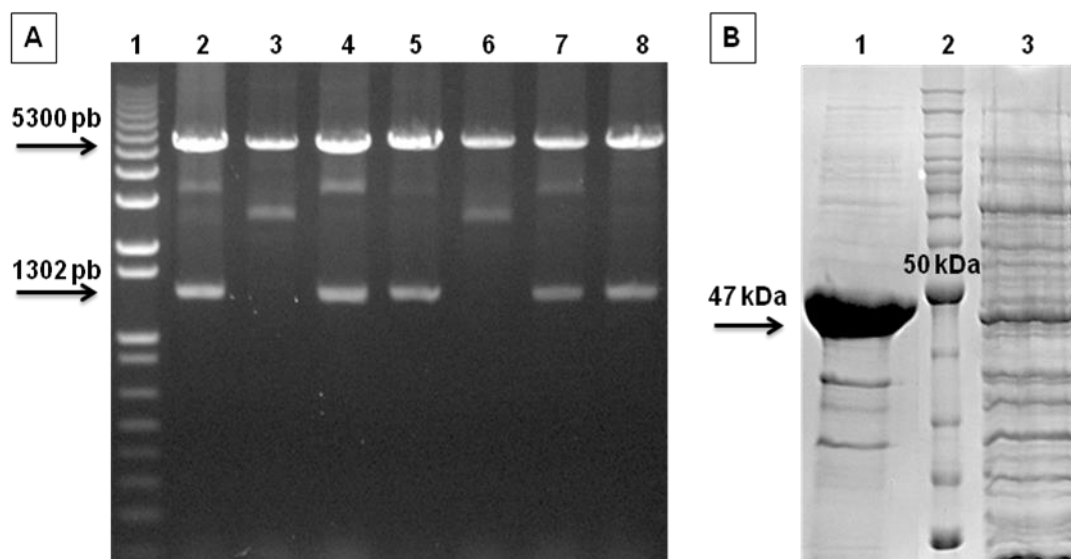


FIGURA 8: (A) Clonagem do gene *pepC* no pET28a e confirmação da liberação do inserto. 1: marcador de massa molecular; 2, 4, 5, 7 e 8: clones positivos que liberaram o inserto de 1302 pb; colunas 3 e 6: clones que não liberaram o inserto. (B) SDS-PAGE do clone positivo 4 estimulado com IPTG. 1: sedimento da cultura apresentando a proteína DAP insolúvel com massa molecular de 47kDa; 2: marcador de massa molecular; 3: sobrenadante da cultura.

5.1.3. Purificação da proteína recombinante rDAP

A proteína recombinante rDAP foi purificada em condição desnaturante em coluna de afinidade ao níquel com base na presença da cauda de histidina na região N-terminal da proteína. A porção não ligada e as eluições foram aplicadas em gel de SDS-PAGE sendo confirmada a purificação da rDAP (Figura 9A). Foram determinadas as concentrações de imidazol onde a proteína ficou mais pura, 40 mM e 400 mM, conforme descrito na figura 8B.

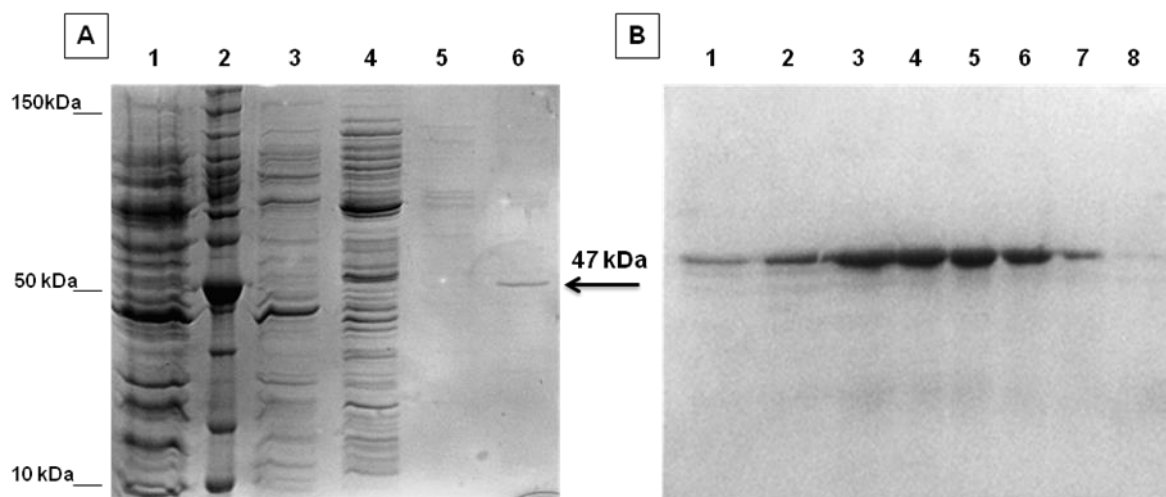


FIGURA 9: (A) SDS-PAGE da purificação da proteína rDAP. 1: porção da proteína que não se ligou na coluna; 2: marcador de massa molecular; 3, 4 e 5: eluições da proteína; 6: porção purificada da rDAP. (B) SDS-PAGE com as diferentes concentrações de imidazol utilizadas para padronização da purificação. 1: imidazol 20 mM; 2: imidazol 40 mM; 3: imidazol 60 mM; 4: imidazol 80 mM; 5: imidazol 100 mM; 6: imidazol 200 mM; 7: imidazol 400 mM; 8: imidazol 800 mM.

5.1.4. Confirmação da produção da protease pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

A proteína recombinante rDAP purificada foi utilizada na hiperimunização de camundongos BALB/c para produção de soro policlonal anti-DAP. O soro foi utilizado para avaliar a expressão da proteína por *M. tuberculosis* cultivado *in vitro* em meio Sauton, pois a albumina contida no meio 7H9 suplementado com OADC interfere na revelação das frações proteicas da cultura. Conforme descrito na Figura 10, foi observada a presença da proteína DAP no sedimento da cultura de Mtb.

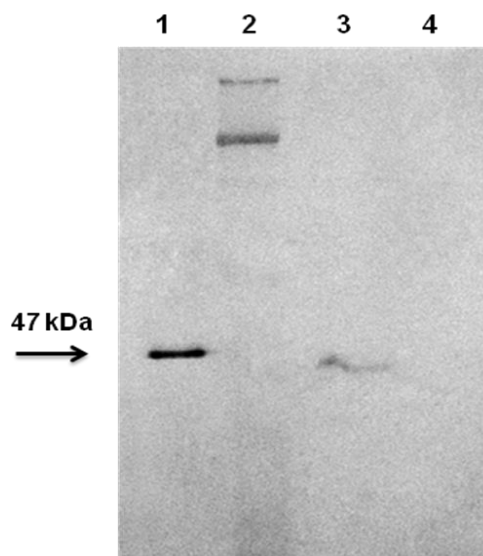


FIGURA 10: Western blot confirmando a expressão da proteína DAP por *Mycobacterium tuberculosis*. 1: rDAP purificada; 2: marcador de massa molecular; 3: sedimento da cultura de Mtb apresentando a banda correspondente a DAP; 4: sobrenadante da cultura de Mtb.

Foi realizada a clonagem do gene que codifica a enzima DAP de Mtb em *E. coli* com posterior produção e purificação da proteína recombinante em quantidade suficiente para utilização da mesma em uma formulação vacinal contra a TB. Além disso, foi confirmada a expressão da referida enzima pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

5.4. Análise da imunogenicidade da proteína recombinante rDAP

5.4.1. Resposta imune humoral

Ao longo das imunizações foi coletado sangue para obtenção de soro e realização do teste de ELISA e verificação da cinética da produção de anticorpos específicos contra a proteína recombinante rDAP.

Após a terceira imunização foi observado uma elevada quantidade de anticorpos das classes IgG1 e IgG2a específicos nos grupos vacinados com DAPC e BCG + DAPC, enquanto os outros grupos não induziram (Figura 11).

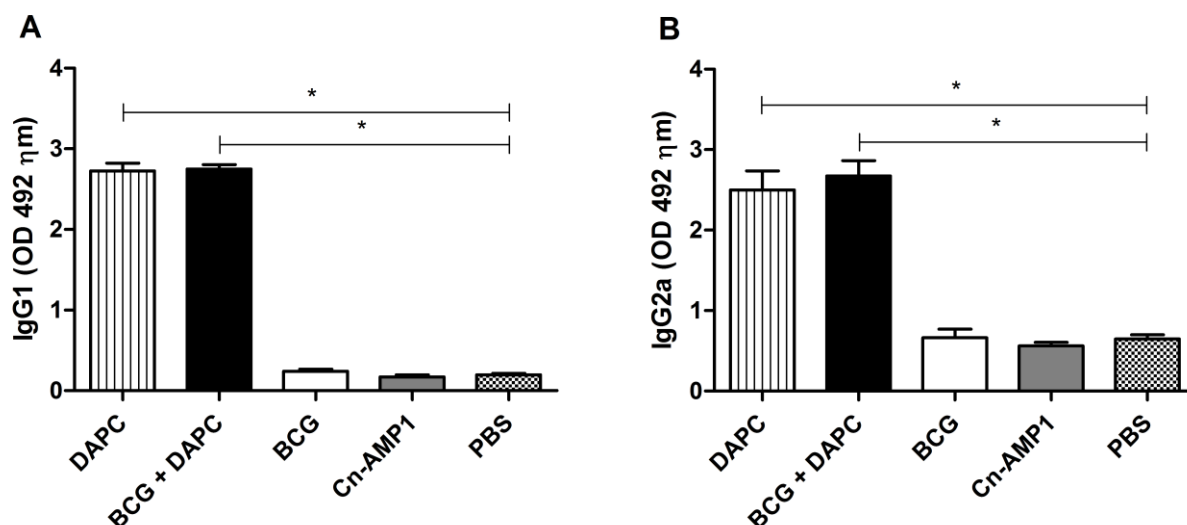


FIGURA 11: Anticorpos IgG1 (A) e IgG2a (B) específicos contra a proteína recombinante rDAP 15 dias após a 3^a imunização (diluição 1/200). *diferença estatística $p < 0,001$. Os grupos foram comparados entre si pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni e foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

Verificou-se que a vacina de subunidade proteica DAPC utilizada sozinha ou combinada com a vacina BCG foi capaz de gerar anticorpos IgG1 e IgG2a específicos ao longo das imunizações (dados não mostrados).

5.4.2. Resposta imune celular

Sessenta dias após a última imunização, três animais de cada grupo foram eutanasiados para a análise da indução de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ produtores de IFN- γ específicos para a proteína DAP. O número dessas células no baço e no pulmão dos camundongos foi avaliado e essas populações celulares foram selecionadas conforme mostrado na Figura 12. Primeiramente pelo tamanho e granulosidade foram selecionados os linfócitos. Dessa população foram escolhidas as células CD4⁺ e, em seguida, as células CD4⁺ IFN- γ ⁺. O mesmo foi feito para os linfócitos TCD8⁺.

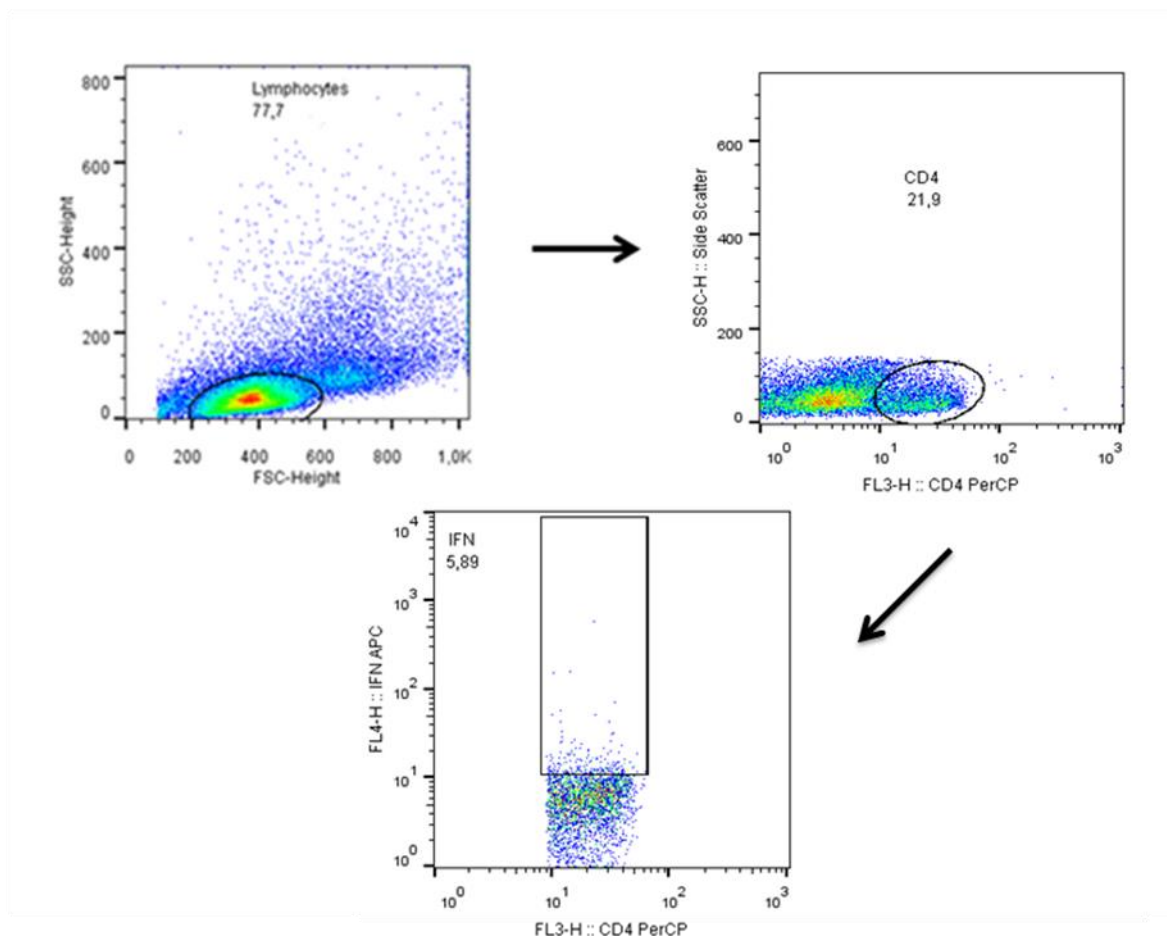


FIGURA 12: Dot Plot representativo do *gate* para seleção de populações de linfócitos TCD4⁺ IFN- γ ⁺. Os linfócitos foram selecionados pelo tamanho e granulosidade. A partir dessa população foram escolhidas as células CD4⁺ e, em seguida, as células CD4⁺ produtoras de IFN- γ ⁺. A mesma análise foi feita para os linfócitos TCD8⁺.

As figuras 13 e 14 mostram a indução de linfócitos TCD4 e TCD8 no baço e no pulmão, respectivamente. A vacina DAPC foi capaz de induzir mais células TCD4⁺ IFN- γ ⁺ específicas no baço (em torno de 4×10^5 células) (Figura 13A) do que no pulmão dos animais imunizados (em torno de 5×10^4 células) (Figura 14A). Quando a vacina DAPC foi combinada com a BCG, melhorou a resposta de linfócitos TCD4⁺ IFN- γ ⁺ no baço gerada pela BCG sozinha (Figura 13C). Entretanto, a BCG sozinha foi melhor indutora de linfócitos TCD8⁺ IFN- γ ⁺ no baço (Figura 13D).

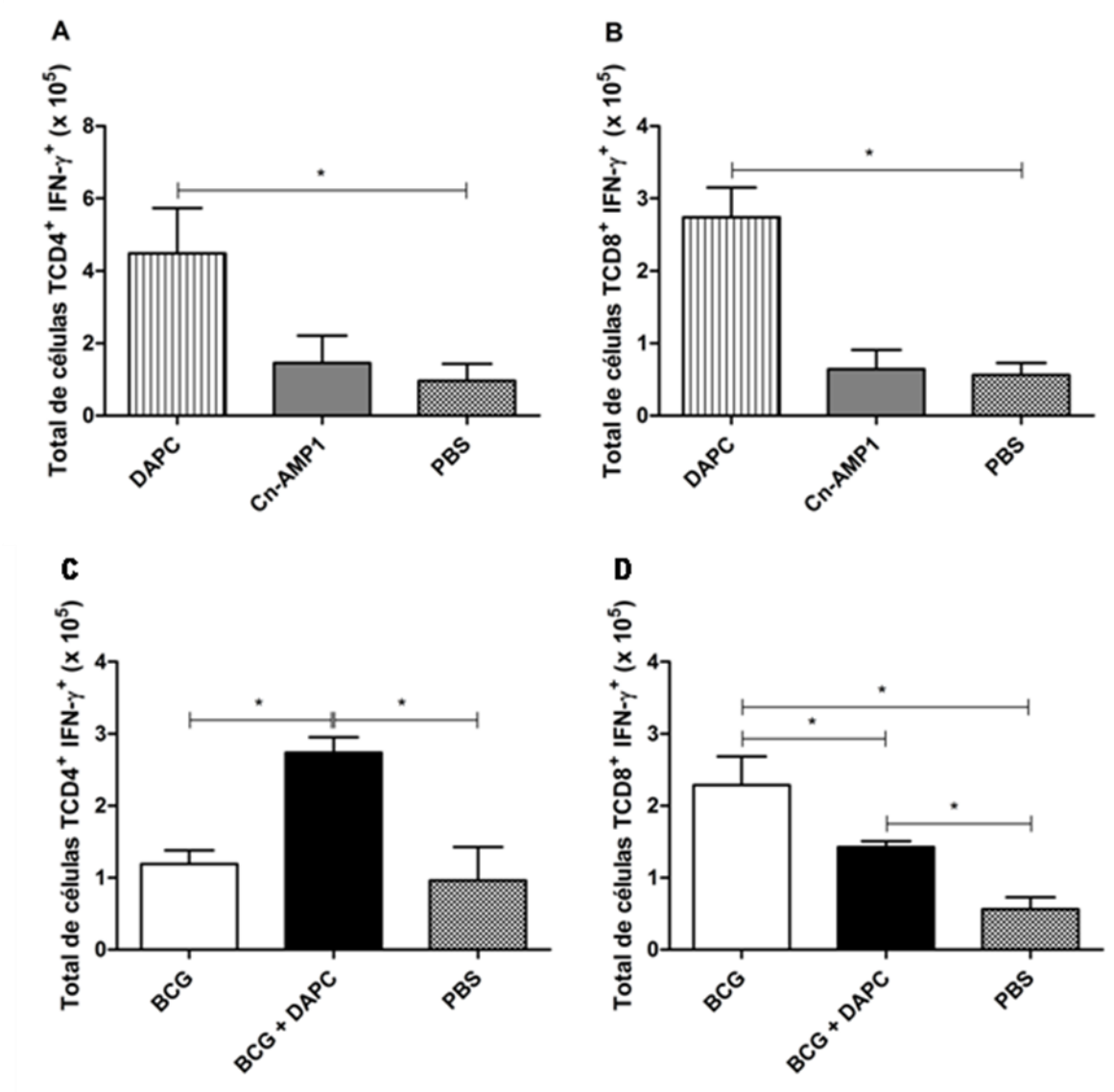


FIGURA 13: Total de linfócitos TCD4⁺ (A e C) e TCD8⁺ (B e D) produtores de IFN- γ no baço dos camundongos 60 dias após a última imunização. Os grupos foram comparados entre si pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni e foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

No pulmão, os animais imunizados com a vacina DAPC apresentaram níveis de células TCD4⁺ IFN- γ ⁺ (Figura 14A) muito superiores aos de células TCD8⁺ IFN- γ ⁺ (Figura 14B). Mas, foi observada uma indução significativa de células TCD4⁺ IFN- γ ⁺ (Figura 14C) e TCD8⁺ IFN- γ ⁺ (Figura 14D) nos camundongos vacinados com a BCG e que receberam posteriormente o reforço com a vacina DAPC.

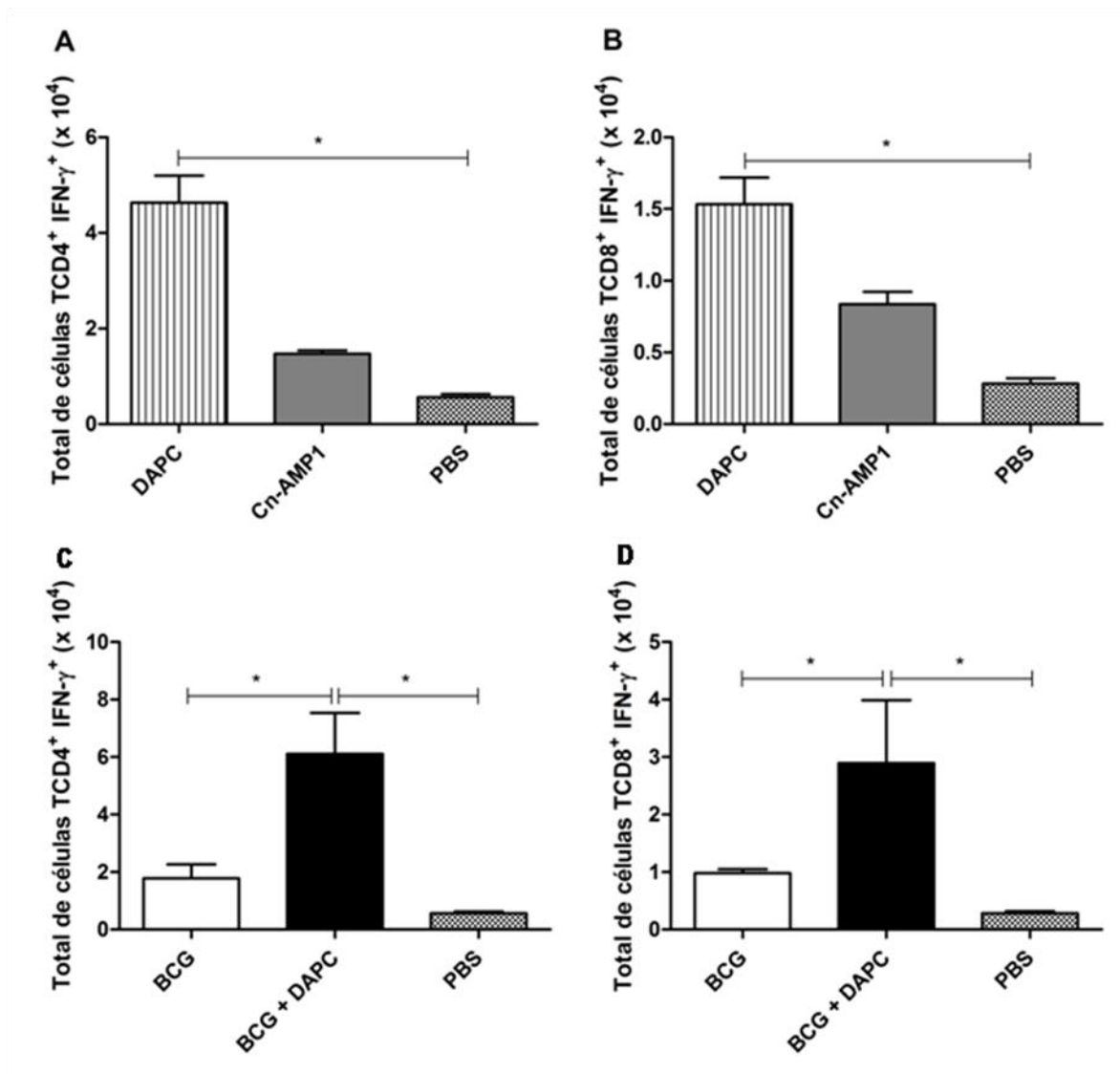


FIGURA 14: Total de linfócitos TCD4⁺ (A e C) e TCD8⁺ (B e D) produtores de IFN- γ no pulmão dos camundongos 60 dias após a última imunização. Os tratamentos foram comparados entre si pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni e foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

As análises da resposta imune celular após a vacinação mostraram que a vacina DAPC é imunogênica no modelo estudado (Quadro 4). Os resultados mais significativos foram no pulmão, onde a vacina DAPC melhorou a resposta induzida pela BCG tanto na proliferação de linfócitos TCD4⁺ quanto na de TCD8⁺ produtores de IFN- γ específicos.

QUADRO 4: Comparação da imunogenicidade gerada pelas diferentes formulações vacinais.

Formulações vacinais	Resposta Imune Humoral	TCD4 ⁺ IFN- γ ⁺ Baço/ Pulmão	TCD8 ⁺ IFN- γ ⁺ Baço/ Pulmão
DAPC	+	+/+	+/+
BCG	---	-/-	+/-
BCG + DAPC	+	+/+	+/+
Cn-AMP1	---	-/-	-/+

Legenda: --- significa que apresentou indução semelhante ao controle negativo.

5.5. Resposta imune induzida pela vacinação e desafio com Mtb

Todos os animais vacinados e desafiados com *M. tuberculosis*, foram eutanasiados para a análise da capacidade protetora da vacina bem como o resgate da resposta imune induzida antes da infecção. Foi novamente avaliada a indução de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a, e dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ produtores de IFN- γ .

5.5.1. Resposta imune humoral após o desafio

Após o desafio foi feita a dosagem de anticorpos para verificar os níveis séricos de IgG1 e IgG2a específicos. Conforme visto durante as vacinações, as quantidades de IgG1 e de IgG2a permaneceram elevadas nos grupos DAPC e BCG + DAPC (Figura 15).

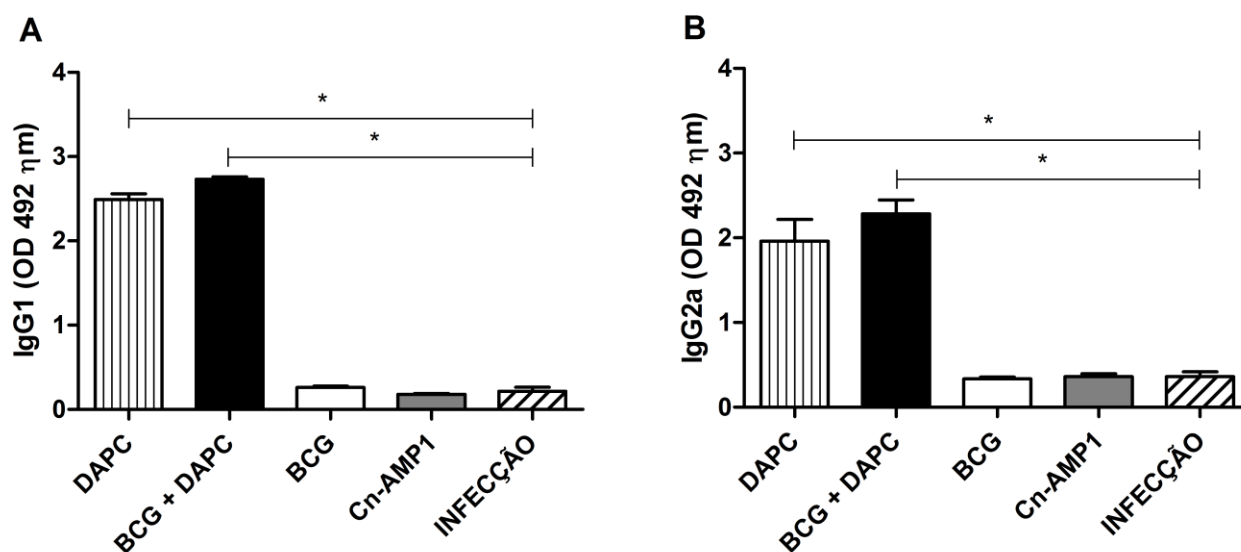


FIGURA 15: Anticorpos IgG1 e IgG2a específicos 30 dias após o desafio com Mtb. *diferença estatística $p < 0,001$. Os grupos foram comparados entre si pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni e foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

5.5.2. Resposta imune celular após o desafio

Após o desafio os linfócitos TCD4 e TCD8 foram avaliados com o intuito de verificar se a resposta gerada pela vacinação seria resgatada durante a infecção. As análises da resposta imune celular no baço mostraram que a infecção sozinha foi melhor indutora de células TCD4⁺ IFN- γ ⁺ (Figura 16A). Em relação aos linfócitos TCD8⁺ IFN- γ ⁺, mesmo não sendo diferente estatisticamente, a vacina DAPC induziu essa população de forma similar a infecção (Figura 16B).

Os animais imunizados com a BCG sozinha apresentaram quantidade de linfócitos TCD4⁺ IFN- γ ⁺ semelhante à infecção. Entretanto, a combinação da BCG com a DAPC, melhorou a resposta induzida de forma significativa (Figura 16C). Os linfócitos TCD8⁺ IFN- γ ⁺ foram mais expressivos no baço dos camundongos apenas infectados, mas os animais imunizados com a formulação BCG + DAPC tiveram níveis similares aos do grupo Infecção (Figura 16D).

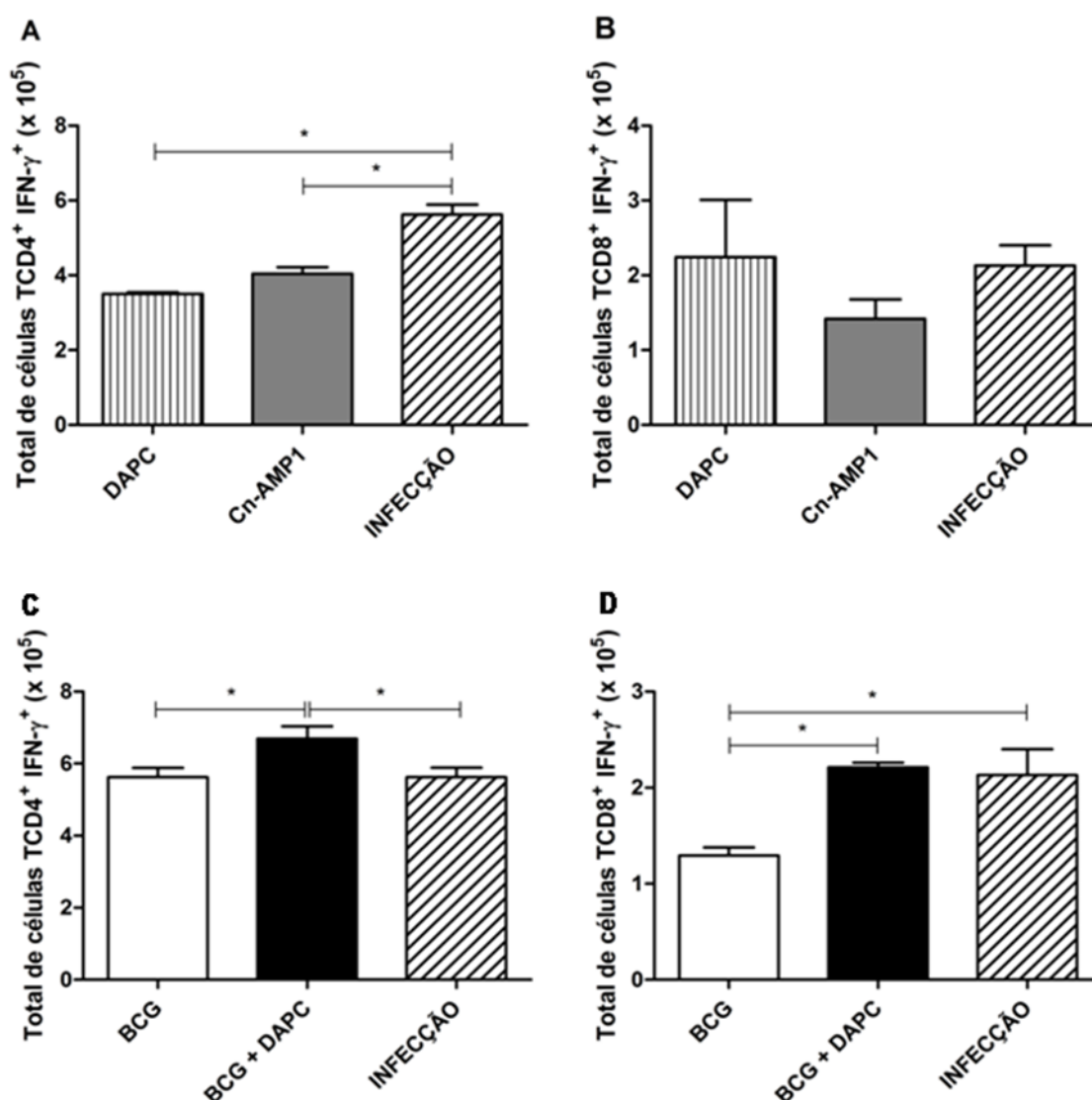


FIGURA 16: Total de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ produtores de IFN- γ no baço dos camundongos 30 dias após o desafio. Os grupos foram comparados entre si pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni e foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

A formulação DAPC foi capaz de gerar uma resposta de células TCD4⁺ (Figura 17A) e TCD8⁺ IFN- γ ⁺ (Figura 17B) mais significativa nos pulmões. A combinação da BCG com a DAPC novamente gerou um aumento na resposta de linfócitos TCD4⁺ IFN- γ ⁺ (Figura 17C) e, principalmente, de TCD8 IFN- γ ⁺ (Figura 17D) quando comparada a resposta induzida pela BCG sozinha.

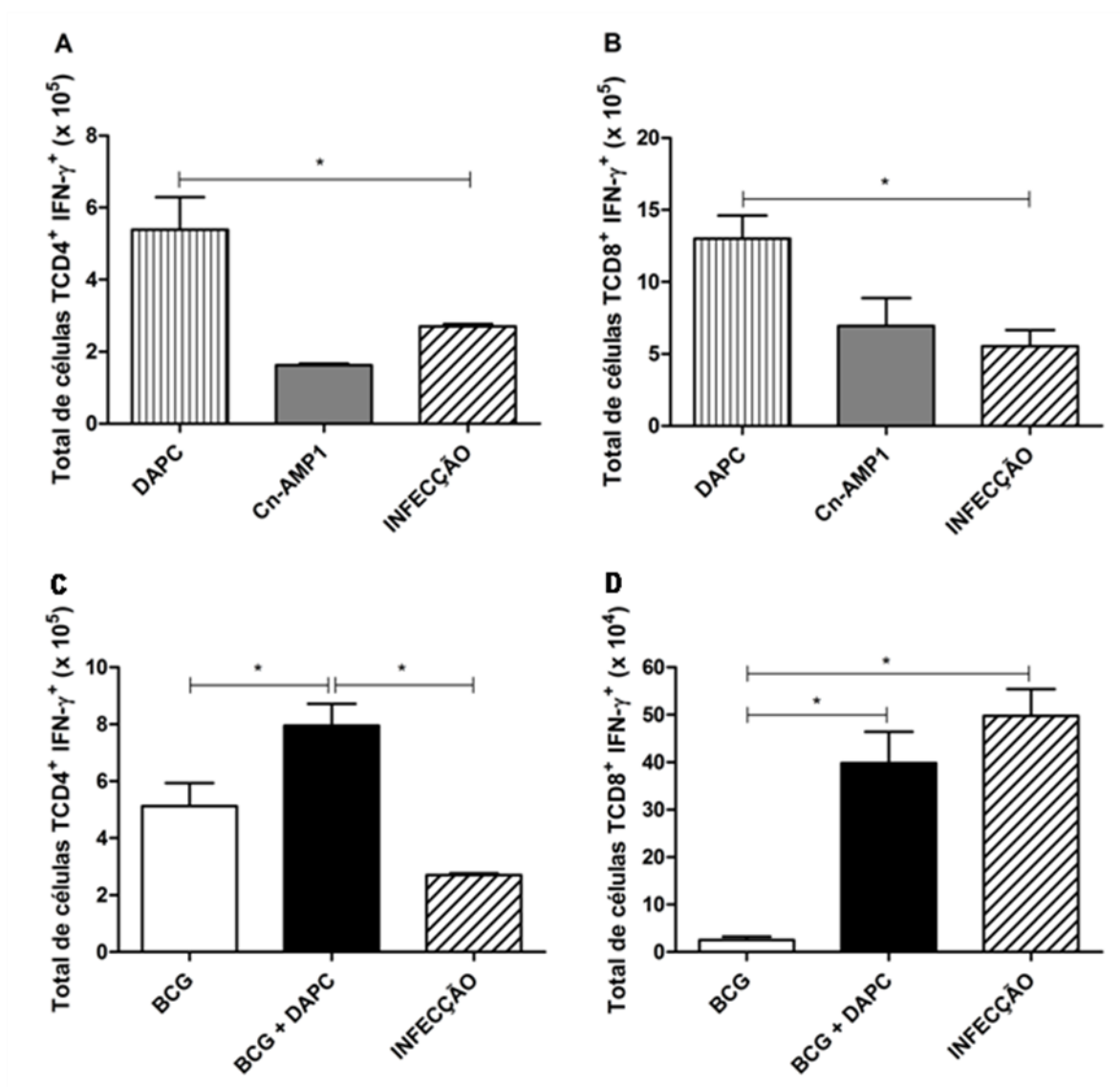


FIGURA 17: Total de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ produtores de IFN- γ no pulmão dos camundongos 30 dias após o desafio. Os grupos foram comparados entre si pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni e foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

Coletivamente estes dados mostram que, após o desafio com Mtb, a combinação da BCG com a vacina de subunidade proteica DAPC melhorou a resposta induzida pela BCG sozinha, tanto de linfócitos TCD4⁺ quanto TCD8⁺ produtores de IFN- γ .

5.6. Análise histopatológica

Aos 30 dias após a infecção com Mtb, os animais foram eutanasiados e os pulmões coletados para a realização de exame histopatológico e imuno-histoquímica (Figuras 18 e 19).

As análises microscópicas mostraram que o grupo PBS manteve a arquitetura pulmonar intacta, com septos inter-alveolares íntegros e sem alterações inflamatórias (Figura 18A). O grupo Infecção apresentou focos de infiltrado inflamatório mononuclear linfocitário difusos (Figura 19A) com alteração do parênquima pulmonar como septos inter-alveolares espessos e congestos (Figura 18B).

O grupo BCG apresentou poucas áreas de lesão e o parênquima pulmonar muito semelhante ao dos animais que apenas receberam PBS (Figura 18C). Os pulmões dos animais imunizados com BCG + DAPC apresentaram lesões mais intensas que os grupos BCG e Infecção. O processo inflamatório, apesar de localizado (Figura 18D), apresentou-se mais extenso que o grupo BCG com regiões de aglomerados celulares em início de formação da estrutura granulomatosa, mas ainda de forma desorganizada, com presença de macrófagos espumosos não clássicos (Figura 19B). Septos inter-alveolares estavam mais espessos e havia algumas áreas de congestão.

O parênquima pulmonar dos animais do grupo DAPC apresentou infiltrado inflamatório moderado com predominância de células mononuclear linfocitárias e regiões de congestão. Foi observado destruição dos septos inter-alveolares nas áreas de infiltração celular mais intensa (Figura 18E) e presença de macrófagos espumosos (Figura 19C). No grupo do adjuvante sozinho, Cn-AMP1, houve inflamação difusa com intensa congestão e áreas de hemorragia focal. Os septos estavam muito espessados com quase o dobro do tamanho normal. Também foram observados macrófagos espumosos não clássicos (Figuras 18F e 19D).

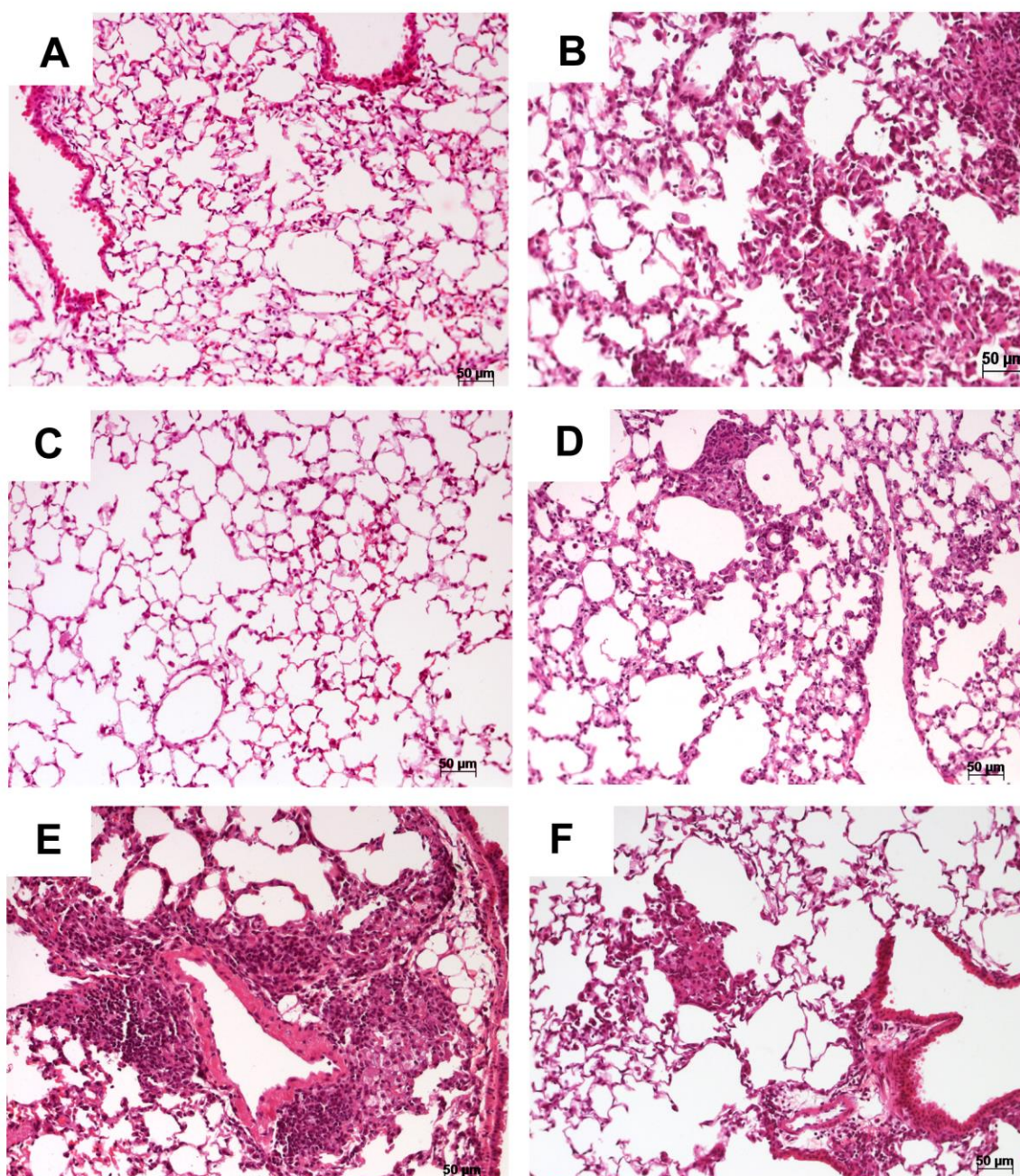


FIGURA 18: Fotomicrografia dos cortes histológicos dos pulmões dos camundongos representativos de cada tratamento, 30 dias após o desafio. (A) pulmão normal: grupo PBS; (B) espessamento de septos inter-alveolares e congestão: grupo Infecção; (C) parênquima pulmonar com poucas lesões: grupo BCG; (D) infiltrado inflamatório mononuclear linfocitário: BCG + DAPC; (E) foco de infiltrado inflamatório mononuclear linfocitário: grupo DAPC; (F) presença de macrófagos espumosos: grupo Cn-AMP1. Aumento de 20X.

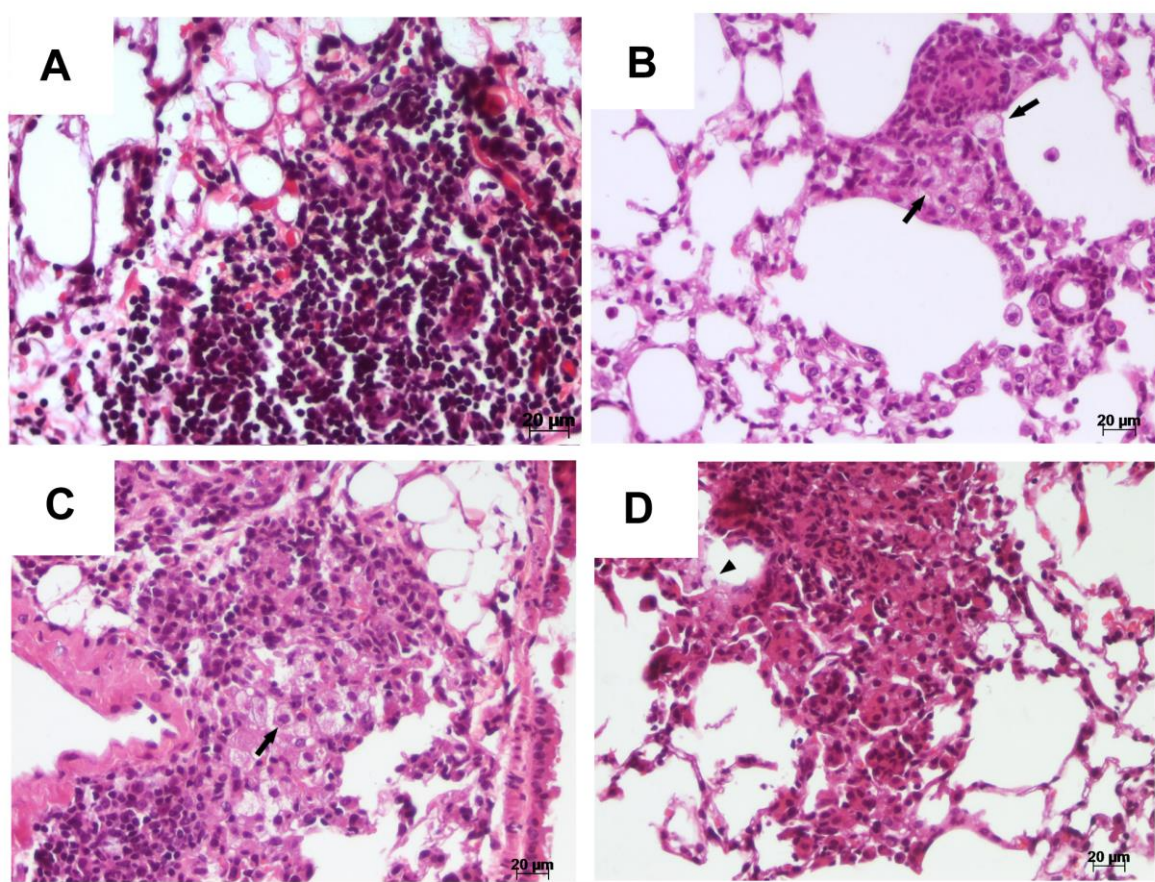


FIGURA 19: Fotomicrografia dos cortes histológicos dos pulmões dos camundongos representativos de cada tratamento, 30 dias após o desafio. (A) focos de infiltrado inflamatório mononuclear linfocitário: grupo Infecção; (B) espessamento de septos inter-alveolares e macrófagos espumosos não clássicos (setas): grupo BCG + DAPC; (C) macrófagos espumosos: grupo DAPC; (D) septos inter-alveolares espessados e presença de macrófagos espumosos (seta): grupo Cn-AMP1. Aumento de 40X.

De acordo com a análise do escore das lesões inflamatórias, os grupos Infecção e Cn-AMP1 foram os que apresentaram maior área de lesão tecidual, seguidos do grupo DAPC, conforme apresentado na Figura 20. Os grupos BCG e BCG + DAPC apresentaram porcentagem de áreas inflamatórias semelhantes.

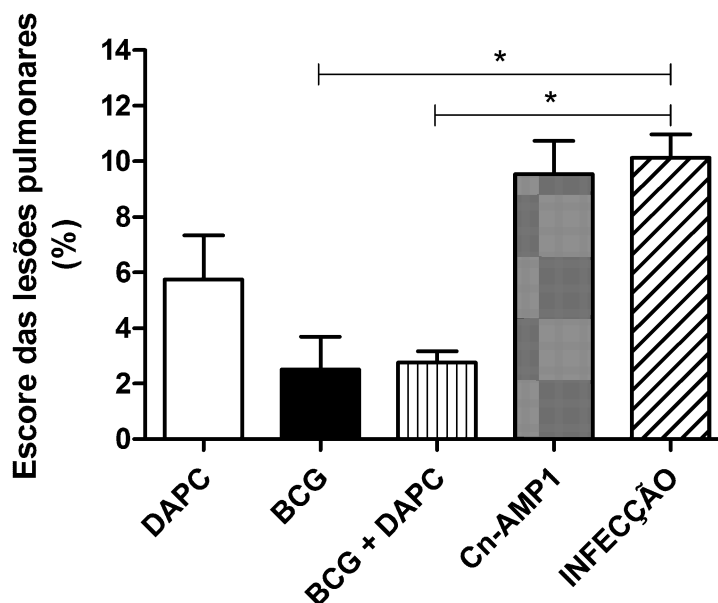


FIGURA 20: Escore das lesões histopatológicas nos cortes de pulmão dos camundongos. *diferença estatística $p < 0,01$. Os tratamentos foram comparados entre si pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni e foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

5.7. Análise imuno-histoquímica e pesquisa de BAAR

Cortes histológicos de pulmão foram preparados para a detecção de TNF- α e de bacilos álcool ácido resistentes no tecido, 30 dias após o desafio.

O grupo PBS não apresentou áreas de coloração positiva para TNF- α (Figura 21A). Extensas áreas de marcação positiva para TNF- α foram observadas no grupo Infecção (Figura 21B). A referida citocina foi encontrada em todos os grupos em menor (Figura 21E) ou em maior intensidade de marcação, como nos grupos BCG, BCG + DAPC e Cn-AMP1 (Figura 21 C, D e F), principalmente nas células epiteliais dos bronquíolos.

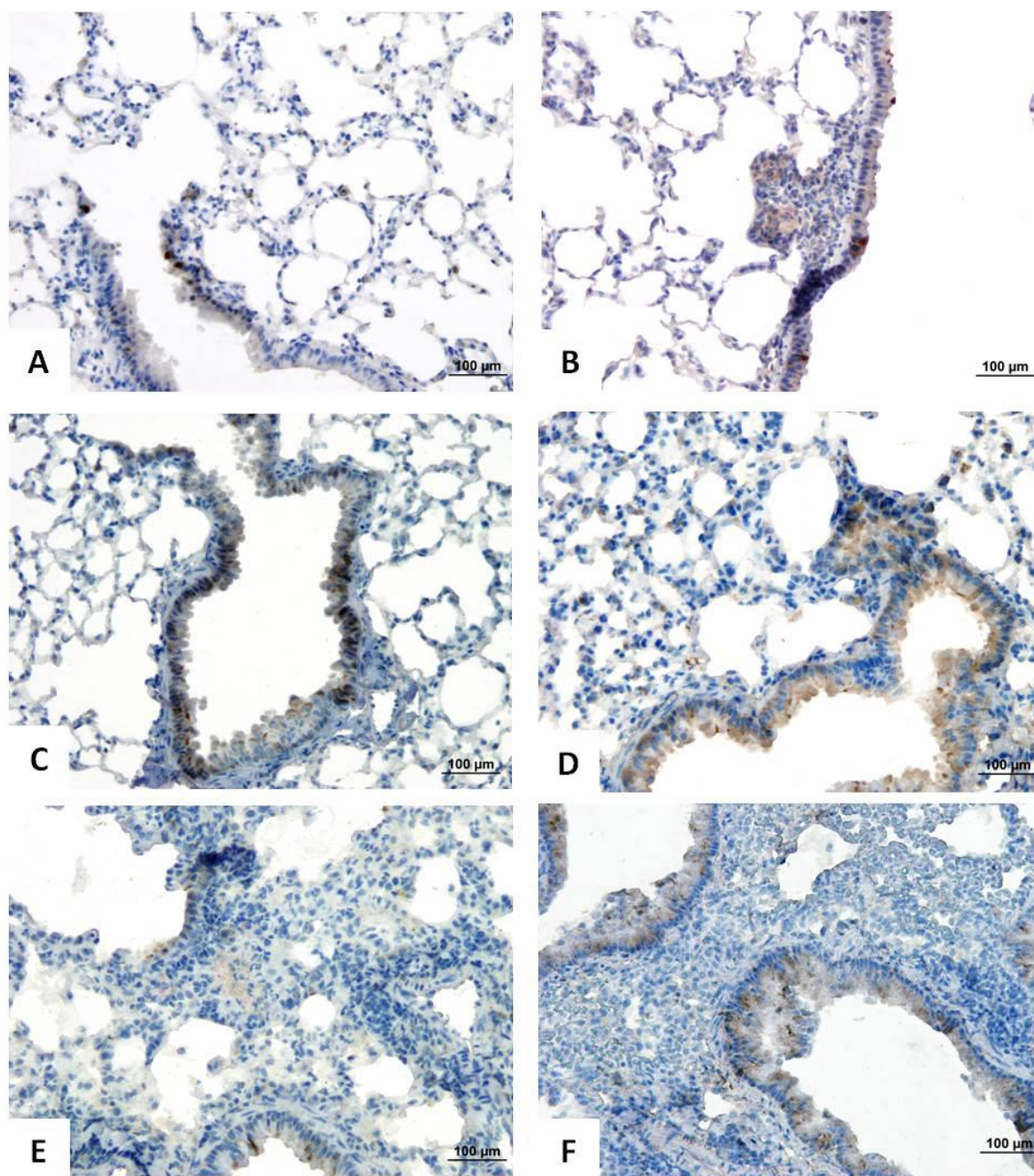


FIGURA 21: Fotomicrografia dos cortes histológicos dos pulmões dos camundongos representativos de cada tratamento, 30 dias após o desafio. Coloração marrom representa positividade para presença de TNF- α . (A) pulmão normal sem presença de coloração positiva para TNF- α : grupo PBS; (B) presença de células epiteliais de alvéolos e bronquíolos com marcação positiva para TNF- α : grupo Infecção; (C) bronquíolo apresentando células epiteliais com marcação positiva para TNF- α : grupo BCG; (D) bronquíolo e alvéolo apresentando células epiteliais com marcação positiva para TNF- α : grupo BCG + DAPC; (E) bronquíolos apresentando células epiteliais com marcação positiva para TNF- α : grupo DAPC; (F) bronquíolos apresentando células epiteliais com marcação positiva para TNF- α Cn-AMP1. Aumento de 20X.

A pesquisa de bacilos álcool ácido resistentes mostrou que, decorridos 30 dias da infecção, os pulmões dos animais apenas infectados (Figura 22A e B) ou que receberam as formulações DAPC e Cn-AMP1 (Figura 22C e E) apresentavam bacilos em quantidades detectáveis. Um dado interessante foi a presença de bactérias em células positivas para TNF e células negativas (Figura 22D e F).

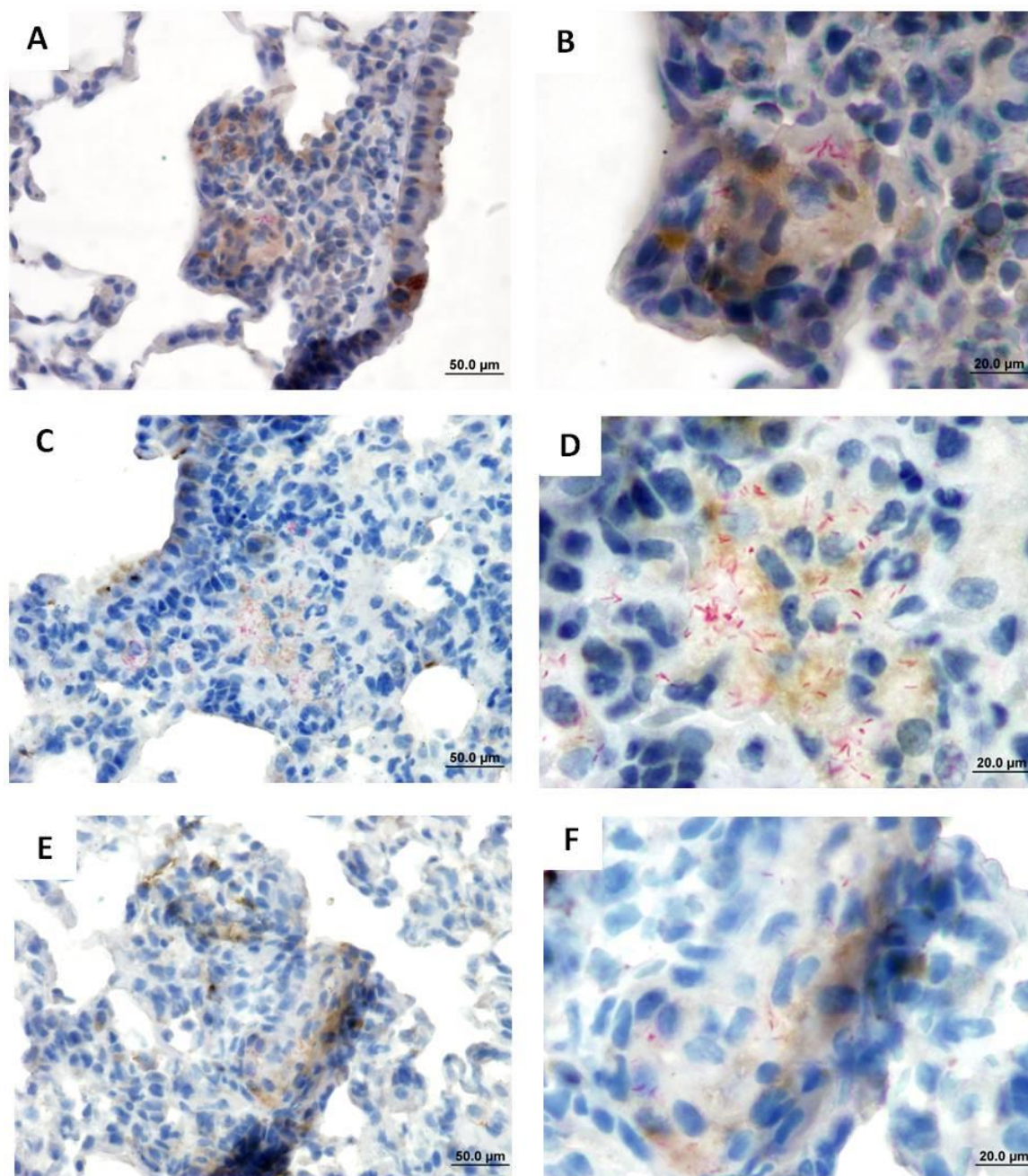


FIGURA 22: Fotomicrografia dos cortes histológicos dos pulmões dos camundongos representativos de cada tratamento, 30 dias após o desafio. Coloração marrom representa positividade para presença de TNF- α . Presença de bacilos álcool ácido resistentes em rosa. Grupos Infecção, 40X (A), Infecção, 100X (B), DAPC, 40X (C), DAPC, 100X (D), Cn-AMP1, 40X (E) e Cn-AMP1, 100X (F).

A análise da área de tecido pulmonar positiva para TNF foi determinada e, como demonstrado na Figura 23, os pulmões dos animais

imunizados com o adjuvante Cn-AMP1 apresentaram maiores áreas de coloração positiva para esta citocina, quando comparados com a infecção sozinha.

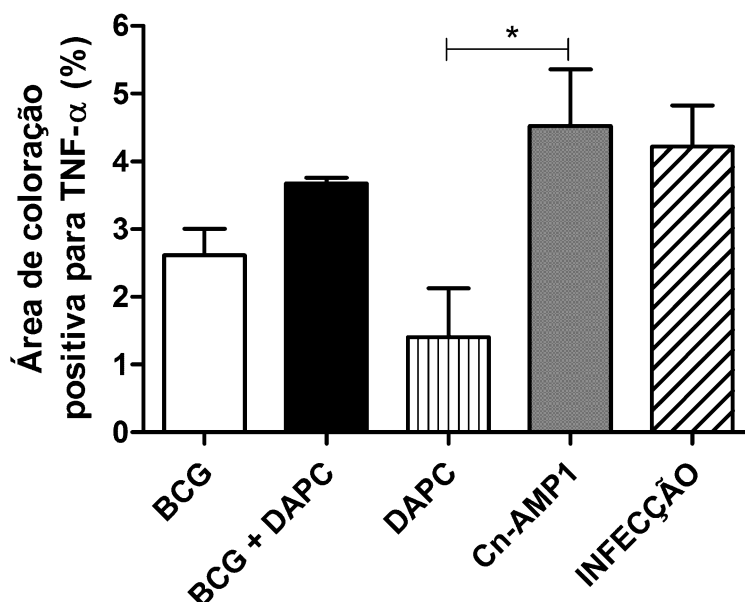


FIGURA 23: Porcentagem de área de tecido pulmonar com coloração positiva para TNF- α . *diferença estatística $p < 0,01$. Os grupos foram comparados entre si pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni e foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

5.8. Capacidade protetora da vacina

Trinta dias após o desafio os lóbulos superiores e médios dos pulmões dos animais foram coletados para determinar a carga bacteriana através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após a infecção e, avaliação da capacidade protetora das formulações vacinais. A vacina DAPC não foi capaz de proteger os animais contra a infecção apresentando alta carga bacilar. Os grupos BCG e BCG + DAPC apresentaram carga bacilar baixa, conferindo proteção devido à imunização com a BCG. O grupo Cn-AMP1 apresentou

contagens semelhantes de UFC aquelas obtidas dos pulmões dos camundongos apenas infectados com Mtb (Figura 24).

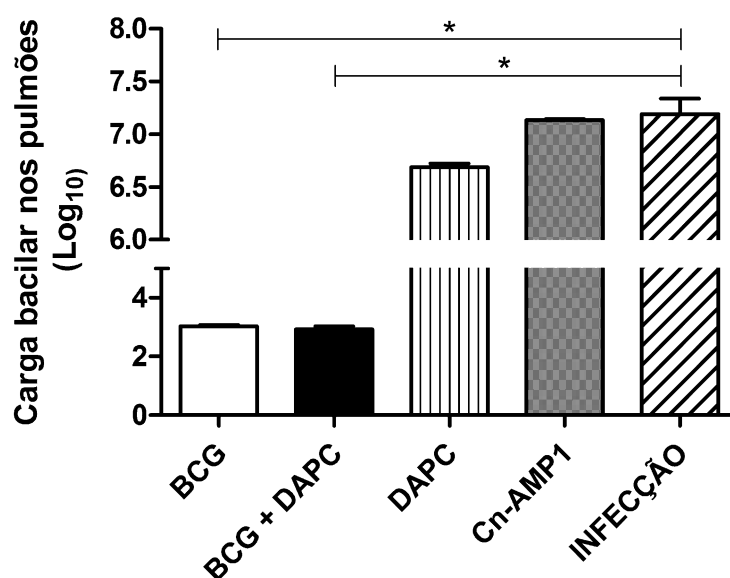


FIGURA 24: Unidades formadoras de colônias (UFC) no pulmão dos camundongos após a infecção com Mtb. *diferença estatística $p < 0,05$. Os grupos foram comparados entre si pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni e foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

A vacina DAPC mostrou-se imunogênica no modelo utilizado principalmente quando combinada com a vacina BCG. Foram induzidos elevados níveis de anticorpos das classes IgG1 e IgG2a específicos, linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ produtores de IFN- γ . Após o desafio, tanto no baço como no pulmão linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ IFN- γ ⁺ foram detectados e os níveis de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a permaneceram elevados. Entretanto, apesar de as respostas humoral e celular geradas pela vacina, não houve proteção significativa gerada pela DAPC. Não houve diferença no número de bacilos presentes no pulmão dos animais imunizados com BCG + DAPC comparado com os vacinados com a BCG sozinha, o que indica que apenas a vacina BCG foi capaz de proteger contra a infecção com Mtb. Os achados histopatológicos corroboram com esta análise, pois mostram que ambos os grupos apresentaram porcentagem de lesões semelhantes no pulmão, evidenciando que a BCG foi capaz de conter a infecção. As lesões inflamatórias encontradas no pulmão dos camundongos vacinados com o peptídeo Cn-AMP1 foram semelhantes as dos animais apenas infectados.

A resposta de células Th1 está associada à indução de anticorpos IgG2a específicos assim como a produção de IFN- γ . Enquanto respostas do tipo Th2 correlacionam-se com anticorpos IgG1 e a produção de citocinas como IL-4 e IL-10, principalmente (FLYNN & CHAN, 2001). Para verificar a capacidade da vacina em induzir resposta imune humoral específica, as diferentes subclasses de anticorpos foram avaliadas. Portanto, a vacina sozinha ou como um reforço para a BCG, foi capaz de induzir níveis elevados de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos contra a proteína rDAP ao longo das imunizações (Figura 11). Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de TRENTINI et al. (2014) que utilizaram a proteína HspX do Mtb associada a um lipossoma microestruturado em diferentes formulações contendo CpG DNA ou MPL. Todas as formulações vacinais contendo a proteína HspX induziram elevados níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos.

Os linfócitos TCD4⁺ são células muito importantes na resposta protetora contra a TB, pois produzem IFN- γ e TNF- α que são citocinas

necessárias na ativação de macrófagos e desempenham um papel primordial no início da infecção pelo Mtb (FLYNN, 2004; ORME, 2011). Somado a isso, essas células também atuam na ativação de linfócitos TCD8⁺, contribuindo com a proteção, especialmente durante a fase crônica de infecções experimentais em camundongos (VAN PINXTEREN et al., 2000; NAMBIAR et al., 2010). Com o intuito de avaliar a indução de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ pela vacinação, foram obtidas células de baço e pulmão dos animais antes e depois do desafio com Mtb. A nova formulação DAPC foi uma boa indutora de imunidade celular tanto no baço como no pulmão, principalmente de células TCD4⁺ IFN- γ ⁺ (Figuras 13A e 14A). Quando os animais imunizados com BCG receberam a DAPC como reforço, esta foi capaz de melhorar a resposta de células TCD4⁺ e TCD8⁺ IFN- γ ⁺ principalmente no pulmão (Figuras 13C e D; 14C e D). Resultados semelhantes foram encontrados por BERTHOLET et al., 2010, que utilizando a vacina ID93 (composta pela fusão de quatro proteínas das famílias PE/ PPE e Esx do Mtb) associada ao adjuvante GLA-SE (solução estável de água e óleo contendo MPL) como reforço para a BCG, verificaram uma indução predominante de linfócitos TCD4⁺. Assim, foi confirmada a capacidade imunogênica da vacina de subunidade proteica no modelo estudado, pois gerou imunidade humoral e celular específicas quando utilizada sozinha ou combinada com a BCG.

Após a confirmação da capacidade imunogênica da vacina, foram feitas as análises pós-infecção com o Mtb para verificar o resgate da resposta imune gerada pela vacinação. 30 dias após o desafio, as imunoglobulinas IgG1 continuaram altas (Figura 15A), enquanto os anticorpos IgG2a tiveram uma ligeira redução, mas ainda permaneceram elevados (Figura 15B). Essa redução pode ser explicada pela combinação dos anticorpos com os antígenos micobacterianos. Esses dados confirmam a forte indução de resposta imune humoral gerada pela vacinação.

Após o desafio, a vacina DAPC induziu células TCD4⁺ IFN- γ ⁺ em níveis semelhantes aos de antes da infecção no baço (Figuras 13A e 16A). Um dado interessante foi o de grupo injetado apenas com o adjuvante ter apresentado níveis de linfócitos TCD4 aumentados após a infecção (Figuras 13A e 16A). Assim como nos resultados da imunogenicidade, os animais que receberam o esquema vacinal BCG + DAPC apresentaram no pulmão níveis de células TCD4

e, principalmente TCD8 produtores de IFN- γ superiores aos induzidos pela vacina BCG (Figura 17C e D), mostrando que a resposta desta última foi melhorada pela DAPC.

Em um estudo com camundongos realizado por HU et al., 2013, uma vacina composta pela fusão dos antígenos Ag85A e ESAT6 (Pe685a) associada ao adjuvante CpG7909, gerou linfócitos TCD4 e TCD8 no baço em maiores proporções do que uma formulação vacinal com a mesma proteína associada ao adjuvante incompleto de Freund (FIA). De acordo com a literatura, a resposta desses linfócitos foi provavelmente devido a presença do CpG7909, já conhecido pela sua forte habilidade em induzir células TCD8⁺ específicas (ROTHENFUSSER et al., 2004; AMLIE-LEFOND et al., 2005). O resultado encontrado no presente estudo acerca dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ produtores de IFN- γ ⁺, antes e depois do desafio, pode estar relacionado à enzima DAP do Mtb, pois ainda não existem dados na literatura que mostrem a capacidade imunogênica dessa proteína. Contudo, outros mecanismos podem estar envolvidos, como a capacidade de o adjuvante Cn-AMP1 em aumentar a expressão de IFN- γ e TNF- α , além de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-12 (SILVA et al., 2012), ativando a resposta de linfócitos T bem como de outras populações celulares. Isso explica o aumento no número de células TCD4 produtoras de IFN- γ após a infecção nos animais injetados apenas com o Cn-AMP1.

Atualmente, uma das preocupações da comunidade científica que se dedica ao desenvolvimento de vacinas contra a TB é a capacidade das mesmas em proteger os indivíduos imunizados e não somente induzir respostas celulares específicas. Algumas formulações vacinais que se mostraram promissoras nas análises iniciais em camundongos acabaram gerando lesões intensas no tecido pulmonar (TAYLOR et al., 2003; HU et al., 2013). Em relação à capacidade protetora da vacina, as lesões presentes nas análises histopatológicas (Figuras 18, 19 e 20) confirmaram os resultados encontrados na contagem das unidades formadoras de colônia, onde os animais imunizados com a BCG e com o esquema BCG + DAPC tiveram menos bacilos por pulmão (Figura 24). O tecido pulmonar desses camundongos foi o que apresentou menor intensidade de lesões com processo inflamatório local e preservação do parênquima pulmonar

(Figura 18C e D). Já os pulmões dos animais que receberam a vacina de subunidade proteica sozinha (Figura 18E) mostraram áreas de lesão mais extensas com maior celularidade e processo inflamatório moderado, além de regiões com destruição do parênquima pulmonar. O grupo vacinado com o adjuvante Cn-AMP1 teve a porcentagem de áreas com lesão inflamatória similar ao grupo Infecção (Figura 20), com pulmões apresentando processo inflamatório difuso, com intensa congestão e septos inter-alveolares muito espessos com o dobro do tamanho normal.

No trabalho realizado por HU et al. (2013), a presença do adjuvante CpG7909 foi capaz de melhorar a resposta já induzida pela vacina Pe685a, entretanto, não houve diminuição na quantidade de bacilos no pulmão nem no dano tecidual gerado pelas lesões no pulmão após a infecção com Mtb. Trabalhos anteriores utilizando o CpG1826 e o CpG2041 também não conferiram proteção contra a infecção pelo Mtb quando comparados com o FIA, mesmo ambos tendo gerado anticorpos específicos e IFN- γ quando utilizados como adjuvantes para a proteína CFP-10 (FONSECA et al., 2007). CHEN et al., 2010 verificaram que cobaias imunizadas com uma proteína de fusão composta por antígenos do Mtb associada ao CpG DNA, tiveram pouco controle na progressão da infecção micobacteriana. Todavia, SILVA et al. (2009), utilizando uma dose baixa de CpG DNA juntamente com a proteína MPT51 do Mtb, observaram um papel protetor do adjuvante nos camundongos vacinados com essa formulação quando comparado com o FIA. Outro trabalho realizado por TRENTINI et al. (2014) verificou que uma formulação vacinal contendo a proteína HspX associada ao lipossoma e ao CpG DNA também foi capaz de proteger camundongos após o desafio intranasal com *M. tuberculosis*. Essas diferentes respostas geradas pelos adjuvantes precisam ser mais bem esclarecidas, já que para vacinas de subunidade proteica a associação a esse tipo de molécula é essencial.

A intensa resposta inflamatória gerada nos pulmões dos animais que receberam a vacina de subunidade proteica sozinha pode estar relacionada com outras citocinas, como o TNF- α , por exemplo. Apesar de não ter sido observada necrose nos pulmões, a predominância de células mononucleares linfocitárias indica que o TNF pode estar envolvido no mecanismo de inflamação. A análise imunohistoquímica confirmou a presença desta citocina em todos os tratamentos

(Figura 21) e nos grupos BCG, BCG + DAPC, Cn-AMP1 e Infecção, foram observadas áreas mais extensas de tecido apresentando essa citocina (Figura 23). Animais vacinados apenas com a DAPC foram os que tiveram menor quantidade de TNF- α no tecido pulmonar, logo o processo inflamatório observado pode estar relacionado com outros mecanismos que não envolvem apenas esta citocina. As maiores produtoras de TNF observadas neste trabalho foram as células epiteliais, que por muitos anos foram negligenciadas no estudo da TB. Entretanto sabe-se que não só macrófagos são produtores de TNF durante a infecção pelo Mtb, mas fibroblastos, células endoteliais, adipócitos e principalmente, as células epiteliais, produzem esta citocina. Especialmente as células epiteliais, pois juntamente com os macrófagos são as primeiras a terem contato com a micobactéria no tecido alveolar (HERNANDEZ-PANDO et al., 2000).

Quando a bactéria entra em contato com as células do epitélio alveolar, elas podem produzir uma série de moléculas antimicrobianas, citocinas e quimiocinas (LIN et al., 1998). Esses mediadores estão diretamente relacionados à migração de monócitos e macrófagos para o sítio de infecção, promovendo a ativação de suas atividades antimicrobianas. Somado a isso, as células do epitélio alveolar possuem moléculas de MHC de classe II, o que permite que elas apresentem antígenos para linfócitos TCD4 (DEBBABI et al., 2005; GEREKE et al., 2009). Além disso, a infecção com Mtb leva as células epiteliais a produzirem MCP-1, uma quimiocina que atrai linfócitos TCD4 (TAUB et al., 1995). Todos esses dados corroboram com os achados do presente estudo, uma vez que células TCD4 foram observadas após o desafio em todos os grupos experimentais.

Durante a análise imunohistoquímica também foi observado que bacilos álcool ácido resistentes estavam presentes em células positivas e negativas para TNF (Figura 23), principalmente nos pulmões dos grupos DAPC, Cn-AMP1 e Infecção. É provável que o Mtb tenha modulado a resposta imune do hospedeiro no modelo utilizado, uma vez que estudos recentes demonstraram que macrófagos infectados podem liberar vesículas exossomais contendo a bactéria, o que recruta e ativa células do sistema imune (SINGH et al., 2011 e 2012). Sabe-se que células infectadas pelo Mtb são parcialmente resistentes a

estimulação pelo IFN- γ e SINGH et al. (2011) demonstraram que macrófagos naive quando expostos aos exossomas derivados de células infectadas se tornam refratários a uma subsequente ativação via IFN- γ . Com essas observações é possível entender a presença de células infectadas, nos pulmões dos animais, negativos para TNF, uma vez que elas podem estar refratárias à ativação pelo IFN γ .

A vacina de subunidade proteica foi capaz de gerar uma resposta imune humoral considerável, além de induzir linfócitos TCD4 e TCD8 produtores de IFN- γ , principalmente quando combinada com a BCG. Entretanto, a resposta de proteção esperada não foi alcançada, pois os animais vacinados apresentaram um processo inflamatório nos pulmões tão intenso quanto os apenas infectados e a carga bacilar foi muito alta. Correlacionando esses resultados pode-se inferir que outras células, que não foram analisadas neste estudo, possam estar envolvidas na indução do processo inflamatório observado, como linfócitos Th17, por exemplo. Foi demonstrado que essa população de linfócitos é responsável pela produção das citocinas IL-17 e IL-23, cujo excesso contribui com a patologia pulmonar induzida pela TB em camundongos (CRUZ et al., 2010). Apesar de a IL-23 também estar relacionada com uma resposta protetora pela indução de IFN- γ , seu papel principal é a manutenção da resposta de IL-17, conhecidamente pró-inflamatória. Somado a isso, KHADER et al. (2011) confirmaram a participação da IL-23 no desenvolvimento de células B foliculares no pulmão de camundongos infectados, dado este que se correlaciona com a presença maciça de anticorpos encontrada neste estudo, já que os linfócitos B se diferenciam em células produtoras de imunoglobulinas. Além disso, citocinas pró-inflamatórias conhecidamente induzidas pelo adjuvante Cn-AMP1 podem ter influenciado na migração de células B como também de linfócitos Th17 para o pulmão.

Diante do exposto conclui-se que uma única proteína do *Mycobacterium tuberculosis* associada a um adjuvante peptídico é capaz de induzir resposta imune humoral e celular específicas, mas não protege os animais após o desafio com Mtb. Logo, estudos mais aprofundados acerca da atividade desta enzima no metabolismo da bactéria, bem como a sua localização precisam ser realizados para um melhor entendimento do papel da DAP na patogenicidade

do agente. Além disso, a associação da enzima a outras proteínas e a outros adjuvantes é um aspecto a ser considerado em análises futuras.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo foi produzida de forma bem sucedida a proteína recombinante rDAP (Rv0800) do *Mycobacterium tuberculosis*, uma aspartil aminopeptidase, pertencente a família M18 de metalo proteases.

Foi confirmado que o *Mycobacterium tuberculosis* produz a enzima, predita como essencial para a sobrevivência *in vivo* e supostamente envolvida na patogenicidade do agente.

Pela primeira vez uma formulação vacinal contendo uma enzima do *Mycobacterium tuberculosis* associada a um adjuvante peptídico da água de coco, nunca testados para tuberculose em modelo murino de infecção, demonstraram potencial imunogênico, mas baixa capacidade protetora.

REFERÊNCIAS

- 1 AMLIE-LEFOND, C.; PAZ, D. A.; CONNELLY, M. P.; HUFFNAGLE, G. B.; WHELAN, N. T.; WHELAN, H. T. Innate immunity for biodefense: a strategy whose time has come. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, p. 1334–1342, 2005.
- 2 BERTHOLET, S.; IRETON, G. C.; ORDWAY, D. J.; WINDISH, H. P.; PINE, S. O.; KAHN, M.; PHAN, P.; ORME, I. M.; VEDVICK, T. S.; BALDWIN, S. L.; COLER, R. N.; REED, S. G. A Defined tuberculosis vaccine candidate boosts BCG and protects against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Science Translational Medicine**, v. 2, p. 53-74, 2010.
- 3 BRANDT, L.; CUNHA, J. F.; OLSEN, A. W.; CHILIMA, B.; HIRSCH, P.; APPELBERG, R.; ANDERSEN, P. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 672–678, 2002.
- 4 CHAN, W. C.; WHITE, P. D. Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach. New York: **Oxford University Press**, v. 222, p. 1–376, 2000.
- 5 CHEN, L.; XU, M.; WANG, Z. Y.; CHEN, B. W.; DU, W. X.; SU, C.; SHEN, X. B.; ZHAO, A. H. The development and preliminary evaluation of a new *Mycobacterium tuberculosis* vaccine comprising Ag85b, HspX and CFP-10: ESAT-6 fusion protein with CpG ODN and aluminum hydroxide adjuvants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, p. 42-52, 2010.
- 6 CRUZ, A.; FRAGA, A. G.; FOUNTAIN, J. J.; RANGEL-MORENO, J.; TORRADO, E.; SARAIVA, M.; PEREIRA, D. R.; RANDALLI, T. D.; PEDROSA, J.; COOPER, A. M.; CASTRO, A. G. Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 8, p. 1609-1616, 2010.
- 7 DEBBABI, H.; GOSH, S.; KAMATH, A. B.; ALT, J.; DE MELLO, D. E.; DUNSMORE, S.; BEHAR, S. M. Primary type II epithelial cells present microbial antigen to antigen-specific CD4+ T cells. **American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 289, n. 2, p. 274-279, 2005.
- 8 DEY, B. JAIN, R.; GUPTA, U. D.; KATOCH, V. M.; RAMANHATHAN, V. D. A booster vaccine expressing a latency-associated antigen augments BCG induced immunity and confers enhanced protection against tuberculosis. **Plos One**, v. 6: e23360, 2011.
- 9 FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 93-129, 2001.

- 10 FLYNN, J. L. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. **Tuberculosis**, v. 84, p. 93-101, 2004.
- 11 FONSECA, D. M.; SILVA, C. L.; PAULA, M. O.; SOARES, E. G.; MARCHAL, G.; HORN, C.; BONATO, V. L. Increased levels of interferon-gamma primed by culture filtrate proteins antigen and CpG-ODN immunization do not confer significant protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Immunology**, v. 121, p. 508-517, 2007.
- 12 GEREKE, M.; JUNG, S.; BUER, J.; BRUDER, D. Alveolar type II epithelial cell present antigen to CD4(+) T cells and induce Foxp3(+) regulatory T cells. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 179, n. 5, p. 344-355, 2009.
- 13 HANEKOM, W. A.; DOCKRELL, H. M.; OTTENHOFF, T. H.; DOHERTY, T. M.; FLETCHER, H.; MCSHANE, H.; WEICHHOLD, F. F.; HOFT, A. F.; PARIDA, S. K.; FRUTH, U. J. Immunological outcomes of new tuberculosis vaccine trials: WHO panel recommendations. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 7:e145, 2008.
- 14 HERNANDEZ-PANDO, R.; JEYANATHAN, M.; MENGISTU, G.; AGUILAR, D.; OROZCO, H.; HAERBOE, M.; ROOK, G.; BJUNE, G. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. **Lancet**, v. 356, p. 2133-2138, 2000.
- 15 HU, S.; CHEN, H.; MA, J.; CHEN, Q.; DENG, H.; GONG, F.; HUANG, H.; SHI, C. CpG7909 adjuvant enhanced immunogenicity efficacy in mice immunized with ESAT6-Ag85A fusion protein, but does not confer significant protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 1203-1211, 2013.
- 16 JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A.; JAMIESON, A.; GONZALEZ-JUARRERO, M.; DIEFENBACH, A.; RAULET, D. H.; TURNER, J.; ORME, I. M.; NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 11, p. 6039-6045, 2003.
- 17 JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; MARQUES-NETO, L. M.; KIPNIS, A. Role of fused *Mycobacterium tuberculosis* immunogens and adjuvants in modern tuberculosis vaccines. **Frontiers in Immunology**, v. 5: 188, doi: 10.3389/fimmu.2014.00188, 2014.
- 18 KAO, F. F.; MAHMUDA, S.; PINTO, R.; TRICCAS, J. A.; WEST, N. P.; BRITTON, W. J. The secreted lipoprotein, MPT83, of *Mycobacterium tuberculosis* is recognized during human tuberculosis and stimulates protective immunity in mice. **Plos One**, v. 7, n. 5: e34991, 2012.
- 19 KAUFMANN, S. H. E.; HUSSEY, G.; LAMBERT, P. H. New vaccines for tuberculosis. **Lancet**, v. 375, p. 85–94, 2010.

- 20 KHADER, S. A.; GUGLANI, L.; RANGEL-MORENO, J.; GOPAL, R.; JUNECKO, B. A. F.; FOUNTAIN, J. J.; MARTINO, C.; PEARL, J. E.; TIGHE, M.
- 21 LIN, Y. Y.; SLIGHT, S.; KOLLS, J. K.; REINHART, T. A.; RANDALL, T. D.; COOPER, A. M. IL-23 is required for long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* and B cell follicle formation in the infected lung. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 10, p. 5402-5407, 2011.
- 22 LIN, Y., ZHANG, M.; BARNES, P. F. Chemokine production by human alveolar epithelial cell line in response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 3, p. 1121-1126, 1998.
- 23 NAMBIAR, J. K.; RYAN, A. A.; KONG, C. U.; BRITTON, W. J.; TRICCAS, J. A. Modulation of pulmonary DC function by vaccine-encoded GM-CSF enhances protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **European Journal of Immunology**, v. 40, p. 153-161, 2010.
- 24 ORME, I. M. Development of new vaccines and drugs for TB: limitations and potential strategic errors. *Future Microbiology*, v. 6, n. 2, p. 161-177, 2011.
- 25 ROTHENFUSSER, S.; HORNING, V.; AYYOUB, M.; BRITSCH, S.; TOWAROWSKI, A.; KRUG, A.; SARRIS, A.; LUBENOW, N. CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide specific primary and memory CD8-T cell responses in vitro. **Blood**, v. 103, p. 2162–2169, 2004.
- 26 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p.2100.
- 27 SINGH, P. P.; LEMAIRE, C.; TAN, J. C.; ZENG, E.; SCHOREY, J. S. Exosomes released from *M. tuberculosis* infected cells can suppress IFN- γ mediated activation of naive macrophages. **PLoS One**, v. 6:e18564, 2011.
- 28 SINGH, P. P.; Smith, V. L.; KARAKOUSIS, P. C.; SCHOREY, J. S. Exosomes isolated from micobacteria-infected mice or cultures macrophages can recruit and activate immune cells *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Immunology**, v. 189, n. 2, p. 777-785, 2012.
- 29 SILVA, O. N.; PORTO, W. F.; MIGLIOLO, L.; MANDAL, S. M.; GOMES, D. G.; HOLANDA, H. H. S.; SILVA, R. S. P.; DIAS, S. C.; COSTA, M. P.; COSTA, C. R.; SILVA, M. R.; REZENDE, T. M. B.; FRANCO, O. L. Cn-AMP1: a new promiscuous peptide with potential for microbial infections treatment. **Peptide Science**, v. 98, n. 4: DOI 10.1002, 2012.
- 30 TAYLOR, J. L.; TURNER, O. C.; BASARABA, R. J.; BELISLE, J. T.; HUYGEN, K.; ORME, I. M. Pulmonary necrosis resulting from DNA vaccination against tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 2192-2198, 2003.

- 31 TRENTINI, M. M.; OLIVEIRA, F. M.; GAETI, M. P. N.; BATISTA, A. C.; LIMA, E. M.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Microstructured liposome subunit vaccines reduce lung inflammation and bacterial load after *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Vaccine**, v. 32, p. 4324-4332, 2014.
- 32 VAN PINXTEREN, L. A.; CASSIDY, J. P.; SMEDEGAARD, B. H.; AGGER, E. M.; ANDERSEN, P. Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8 T cells. **European Journal of Immunology**, v. 30, p. 3689-3698, 2000.

CAPÍTULO 3- AVALIAÇÃO DO ADJUVANTE ADVAX EM ASSOCIAÇÃO COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE DAP NO MODELO MURINO DE INFECÇÃO.

RESUMO: Com este estudo objetivou-se avaliar se a associação da proteína recombinante rDAP com uma nova molécula adjuvante geraria proteção no modelo de infecção murina. O adjuvante utilizado foi o ADVAX, um polissacarídeo derivado da inulina que já apresentou resultados promissores quando associado a outros antígenos, como os das vacinas contra influenza e hepatite. Duas formulações do adjuvante foram testadas, ADVAX1 e ADVAX2, formando as vacinas de subunidade proteica DAPVAX1 e DAPVAX2. Os camundongos foram separados em grupos de quatro animais e imunizados duas vezes com as vacinas correspondentes com intervalos de 21 dias. Foi coletado soro 15 dias após cada imunização para verificação da imunogenicidade das novas formulações vacinais e tanto DAPVAX1 quanto DAPVAX2 induziram anticorpos das classes IgG1 e IgG2a específicos apenas após a segunda imunização. DAPVAX2 foi melhor indutora de IgG2a quando comparada com DAPVAX1. Após a infecção houve uma diminuição significativa principalmente de IgG2a no grupo DAPVAX2. A análise histopatológica mostrou que os animais vacinados com as novas formulações apresentaram lesões inflamatórias semelhantes ao grupo Infecção. Nenhuma das vacinas testadas foi capaz de proteger os camundongos contra a infecção endovenosa com Mtb.

Palavras chave: vacina de subunidade, inulina, anticorpos, tuberculose.

CHAPTER 3- EVALUATION OF THE ADVAX ADJUVANT ASSOCIATED WITH THE RECOMBINANT PROTEIN DAP IN THE TUBERCULOSIS MURINE MODEL.

ABSTRACT: The present study aimed to evaluate if the association of the protein rDAP with a new adjuvant molecule could generate protection in the murine model of infection. The ADVAX adjuvant, a polisaccharide derived from delta inulin that already presented promising results when associated with other vaccine antigens, such as influenza and hepatitis. Two adjuvants formulations were tested, ADVAX1 and ADVAX2, that comprising the subunit protein vaccines DAPVAX1 and DAPVAX2. Mice were separated in groups of four animals and immunized twice with 21 days of interval. Fifteen days after each vaccination serum was collected in order to evaluate the antibody induction. Both vaccine formulations induced specific immunoglobulins IgG1 and IgG2a after the second immunization, and DAPVAX2 induced higher levels of IgG2a compared to those induced by DAPVAX1. After the infection a considerable reduction, especially of IgG2a were observed in the group DAPVAX2. The histopathology analisys showed that the animals immunized with the new formulations presented inflammatory lesions similars to the infection group. DAPVAX1 and DAPVAX2 were not able to protect mice against the endovenous infection with *M. tuberculosis*.

Keywords: subunit vaccine, inulin, antibodies, tuberculosis

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas moléculas adjuvantes é um desafio no estudo de vacinas contra as mais diversas doenças infecciosas. Os compostos a base de alumínio (fosfato ou hidróxido) são usados desde o início dos anos 90 e ainda são considerados os mais seguros, mesmo havendo mais de 100 adjuvantes descritos na literatura científica. Sabe-se que o efeito imunoadjuvante do alumínio está associado a resposta pró-inflamatória, incluindo a indução no aumento da captação e apresentação de antígenos por APCs, e aumento da produção e liberação de citocinas (DE GE et al., 2009; TRITO et al., 2009). Contudo o acúmulo dessa substância gera um potencial de toxicidade (PETROVSKY, 2006). Em 1936, Freund et al. desenvolveram uma emulsão de água e óleo mineral contendo micobactéria morta, criando assim o adjuvante completo de Freund (FCA), o qual ainda é um dos mais potentes adjuvantes conhecidos, um potente estimulador de imunidade celular e humoral (FREUND et al., 1937). Contudo, o FCA gera severos efeitos colaterais e é tóxico para humanos.

Alguns requisitos a serem avaliados na escolha de um adjuvante são: o antígeno, a espécie a ser vacinada, a rota de administração, os possíveis efeitos colaterais e a necessidade de estimular resposta humoral e/ou mediada por células (ALLISON et al., 1991; EDELMAN, 2002). Um adjuvante ideal deve promover uma resposta imune apropriada, seja Th1 ou Th2, ser estável com longa vida de prateleira, ser biodegradável, ser barato para produzir e não ser imunogênico por si só (EDELMAN, 1980). Os benefícios gerados pela incorporação de um adjuvante numa formulação vacinal devem ser balanceados com o risco de reações adversas induzidas por esses compostos. Uma forte atividade adjuvante geralmente está relacionada com aumento de toxicidade, como no caso do FCA. O maior desafio nas pesquisas de adjuvantes é justamente aumentar a atividade da molécula reduzindo a toxicidade (GUPTA et al., 1993).

Nesse contexto os adjuvantes a base de inulina apresentam pontos positivos, pois promovem uma forte resposta, similar a gerada pelo FCA, mas

sem serem tóxicos. A inulina é um polissacarídeo neutro, de natureza não ionizada e é o carboidrato de reserva de plantas da família *Compositae* (SILVA et al., 2004). Derivados deste carboidrato tem a capacidade de ativar o complemento e ele foi uma das primeiras substâncias usadas com este propósito. Quando soro humano é incubado com a inulina, o complemento é ativado até a sua exaustão. Esta propriedade foi a responsável pela primeira demonstração da via alternativa do sistema complemento (GOTZE et al., 1971).

O ADVAX™ é um adjuvante derivado da inulina e que tem apresentado bons resultados em modelos animais como hepaptite B, influenza H1N1, malária (SILVA et al., 2004) e vírus da encefalite japonesa (LARENA et al., 2013; PETROVSKY et al., 2013). Logo, por apresentar essas características desejáveis para um adjuvante, o ADVAX foi utilizado neste trabalho com o intuito de melhorar a resposta imune induzida pela proteína recombinante DAP no modelo de TB murina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Proteína rDAP

O mesmo lote de proteína recombinante descrito no capítulo 2 deste documento foi utilizado nos experimentos a seguir.

2.2. Adjuvante ADVAX

O adjuvante ADVAX™ foi gentilmente cedido pelo Dr Nikolai Petrovsky (Universidade de Flinders, Austrália), mediante assinatura de convênio de confidencialidade com Vaxine Pty Ltda (Anexo 2). Duas formulações foram utilizadas, ADVAX1 e ADVAX2, e as formulações não foram informadas.

2.3. Desenho experimental

Os camundongos foram agrupados ao acaso em seis grupos de quatro animais. Cada grupo recebeu o seguinte esquema vacinal:

- Grupo 1 (Controle Negativo-PBS): camundongos injetados duas vezes com 100 µL de PBS estéril, por via subcutânea (SC) com intervalo de 21 dias entre cada imunização;
- Grupo 2 (DAPVAX1): camundongos imunizados duas vezes com 100 µL da vacina de subunidade protéica composta pela proteína recombinante rDAP (20µg/mL) associada ao adjuvante ADVAX1, por via subcutânea (SC) com intervalo de 21 dias entre cada imunização;
- Grupo 3 (DAPVAX2): camundongos imunizados duas vezes com 100 µL da vacina de subunidade protéica composta pela proteína recombinante rDAP (20µg/mL) associada ao adjuvante ADVAX2, por via subcutânea (SC) com intervalo de 21 dias entre cada imunização;

- Grupo 4 (ADVAX1): camundongos injetados duas vezes com 100 μ L do adjuvante ADVAX1 por via subcutânea (SC) com intervalo de 21 dias entre cada imunização;
- Grupo 5 (ADVAX2): camundongos injetados duas vezes com 100 μ L do adjuvante ADVAX2 por via subcutânea (SC) com intervalo de 21 dias entre cada imunização;
- Grupo 6 (Controle Infecção): camundongos injetados duas vezes com 100 μ L de PBS estéril, por via subcutânea (SC) com intervalo de 21 dias entre cada imunização.

Trinta dias após a infecção, todos os animais do esquema vacinal foram eutanasiados para análise da resposta imune induzida e eficácia protetora da vacina (Figura 1).

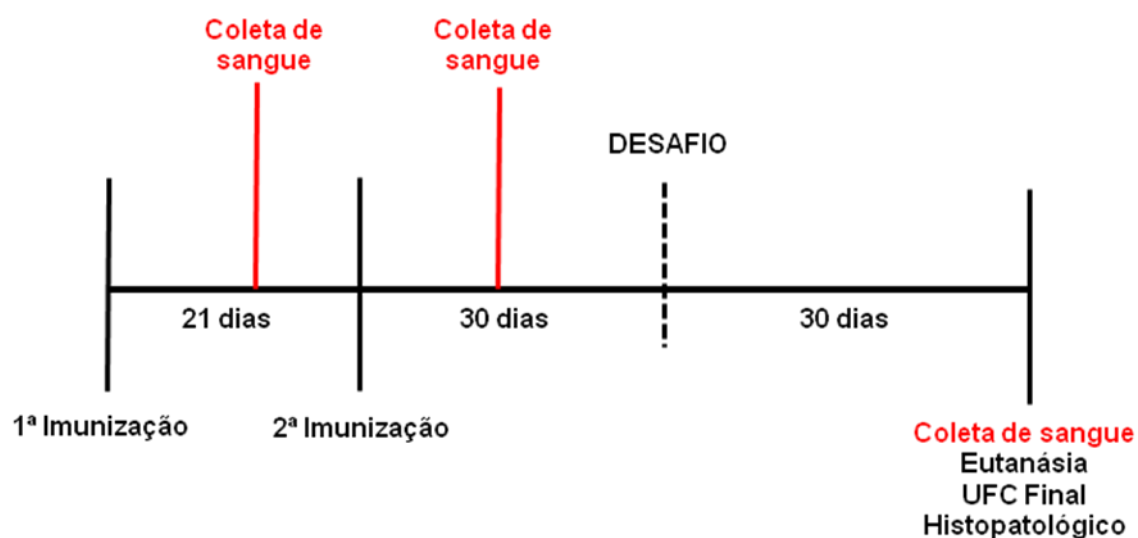


FIGURA 1: Esquema vacinal do estudo com as respectivas imunizações e pontos experimentais.

2.4. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Foi coletado sangue dos camundongos para a obtenção de soro e realização da técnica de ELISA para a detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos contra rDAP. As imunizações foram realizadas com intervalos de 21 dias e um dia antes de cada vacinação foi coletado o sangue dos animais. Placas de poliestireno de 96 orifícios (Ultra Cruz) foram adsorvidas com 50 µL/poço de rDAP (10 µg/mL) diluída em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M (pH 9,6) e incubadas por 18 h a 4°C. Após este período, as placas foram bloqueadas por 2 h a 37°C com 100 µL/poço de tampão carbonato/bicarbonato de sódio contendo gelatina a 0,5%. As amostras de soros foram diluídas a 1:200 e 1:400 e adicionadas nos orifícios (50 µL/poço), com posterior incubação por 2 h a 37°C. Em seguida as placas foram lavadas seis vezes com PBS Tween 20 a 0,05%, com intervalos de 5 minutos entre as lavagens. Os anticorpos conjugados a biotina (anti-mouse IgG1 e IgG2a Pharmingen) foram diluídos a 1:5000 em PBS contendo gelatina 0,05% (PBSg) e 50 µL da solução foi adicionada em cada orifício das placas. Após a incubação por uma hora a 37°C, as placas foram lavadas seis vezes com PBS Tween 20 0,05%. A estreptoavidina-peroxidase (BD Biosciences) foi diluída em PBSg a 1:10000 e 50 µL dessa solução foi adicionada em cada poço com posterior incubação por uma hora a 37°C. Após a incubação foram realizadas mais seis lavagem antes da revelação. A reação foi revelada com a adição de 50 µL/poço de tampão citrato-fosfato pH 4,5 contendo OPD (ortho-phenylenediamine - Merck) e água oxigenada a 20 V. A reação enzimática foi finalizada com a adição de 50 µL/ poço de ácido sulfúrico 4 N. As placas foram lidas a 492 nm na leitora de ELISA (Labsystems Multiskan Thermo).

2.5. Infecção endovenosa com *Mycobacterium tuberculosis*

A cepa de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) fornecida pela Universidade do Estado do Colorado (Colorado State University, Fort Collins, Colorado, Estados Unidos) foi cultivada em meio 7H9 suplementado com OADC

(ácido oleico albumina dextrose catalase), contendo Tween 80 a 0,05% até a fase log de crescimento bacteriano, depois foram alíquotadas e mantidas em freezer a - 80°C. O estoque foi plaqueado e quantificado um mês após o congelamento. Diluições centesimais do estoque foram plaqueadas em meio 7H11 suplementado com OADC e as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas. No dia da infecção, o inóculo foi diluído em PBS Tween 80 a 0,05% na concentração de 10^6 UFC/ mL e 100 μ L do inóculo foi administrado por via endovenosa (via plexo retro-orbital), sendo inoculado, portanto 10^5 UFC/ animal.

2.5.1. Determinação da carga bacteriana.

Um dia após a infecção, um camundongo de cada grupo foi eutanasiado e todo o pulmão foi removido e homogeneizado em PBS Tween 80 a 0,05%. O homogenato foi plaqueado em meio 7H11, suplementado com OADC, para verificar a carga bacteriana na infecção. Passados 30 dias da infecção, a carga bacteriana foi determinada pelo plaqueamento do homogenato do lobo superior e médio do pulmão de um animal de cada grupo em meio 7H11 suplementado com OADC. As colônias foram quantificadas após 21 dias de incubação em estufa de CO₂ a 5% a 37°C.

2.6. Histopatológico

Trinta dias após a infecção endovenosa, o lóbulo pulmonar inferior direito de cada animal foi fixado com formol a 10% tamponado. Os espécimes foram processados em histotécnico automático, incluídos em parafina e seccionados em micrótomo (Leica RM2165). Obteve-se de cada bloco cortes consecutivos de 5 μ m que foram colocados sobre lâminas histológicas e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE) para análise em microscopia óptica (Axio scope.A1_ Carl Zeiss), utilizando o programa AxioVision 4.7. Os eventos microscópicos avaliados nestes cortes histológicos foram: intensidade de

infiltrados inflamatórios, presença ou não de macrófagos espumosos e áreas de necrose.

2.7. Análise estatística

Os resultados apresentados neste trabalho foram tabulados no Prism 5 software (Graphpad Software 5.0), expressos como média $\pm$ desvio padrão (SD). A comparação entre os grupos foi dada pela análise de variância (ANOVA). Análise estatística múltipla (ANOVA one way, seguido de teste de Bonferroni) foi utilizada para avaliar as possíveis diferenças entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Resposta imune humoral induzida pelas formulações vacinais contendo o adjuvante ADVAX, antes e depois do desafio.

Quinze dias após a primeira imunização, nenhuma das formulações vacinais contendo o adjuvante ADVAX induziram níveis significativos de IgG1 e IgG2a específicos contra a proteína DAP (Figura 2).

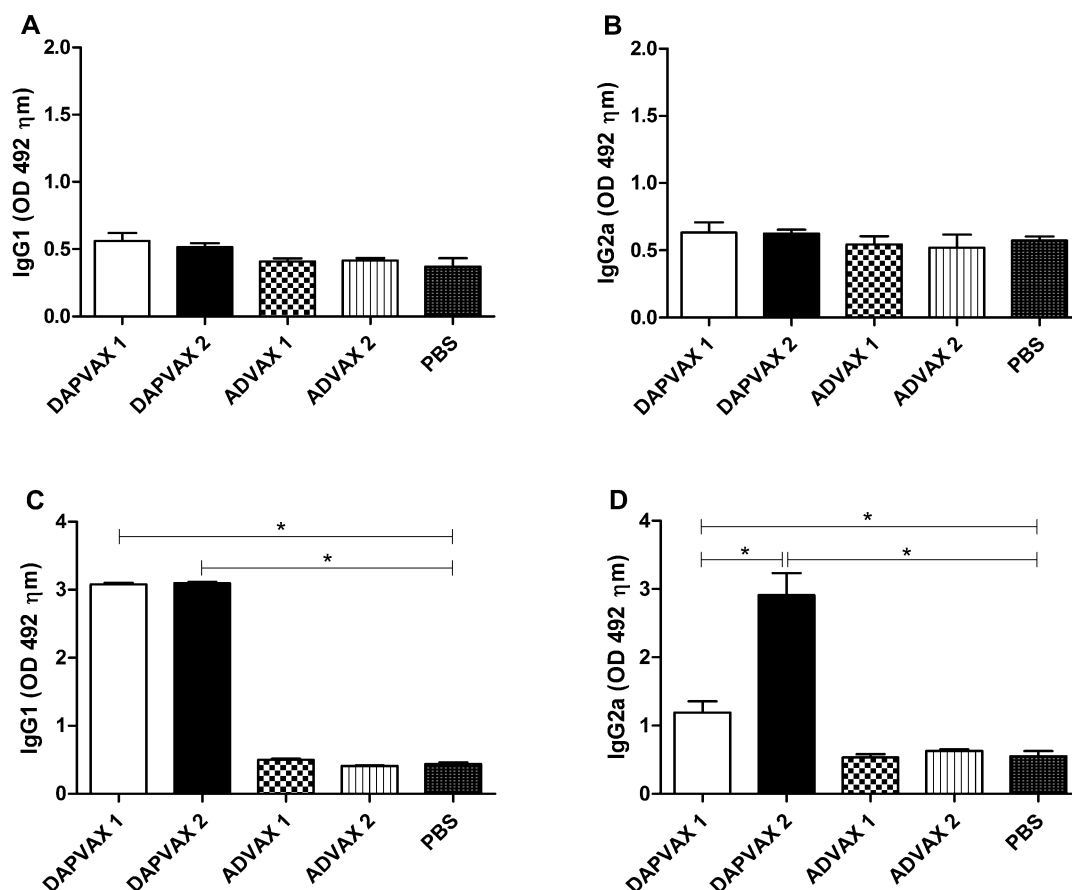


FIGURA 2: Indução de anticorpos IgG1 (A) e IgG2a (B) específicos contra a proteína recombinante rDAP 15 dias após a 1ª imunização (diluição 1/200); Indução de anticorpos IgG1 (C) e IgG2a (D) específicos contra a proteína recombinante rDAP 15 dias após a 2ª imunização (diluição 1/200). *diferença estatística $p < 0,01$. Os grupos foram comparados entre si pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni e foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

Após a segunda imunização os títulos de Ig1 e IgG2a aumentaram com relação aos controles (Figura 2). A formulação DAPVAX1 não foi tão boa indutora de anticorpos da classe IgG2a quando comparada com a vacina DAPVAX2 (Figura 2B).

Depois do desafio os níveis séricos de anticorpos IgG1 e IgG2a foram novamente avaliados. Ambas as classes de imunoglobulinas diminuíram (Figura 3), entretanto anticorpos IgG2a induzidos pela formulação DAPVAX2 tiveram uma queda mais acentuada (Figura 3B).

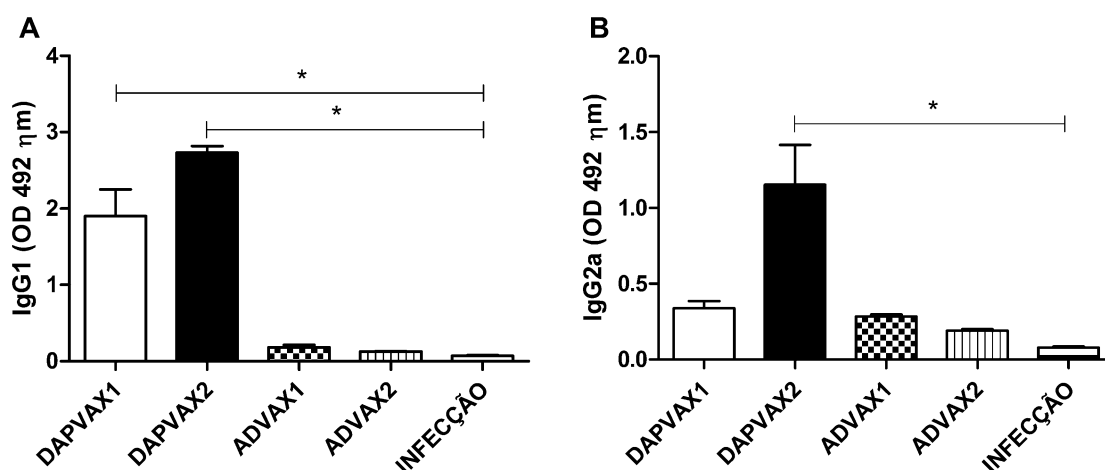


FIGURA 3: Anticorpos IgG1 (A) e IgG2a (B) específicos contra a proteína recombinante rDAP 30 dias após o desafio. *diferença estatística $p < 0,01$. Os grupos foram comparados entre si pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni e foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

3.2. Análise histopatológica após o desafio

Trinta dias após o desafio os camundongos de todos os grupos foram eutanasiados e os pulmões coletados para realização de exame histopatológico.

A análise microscópica do grupo PBS mostrou preservação do parênquima pulmonar sem alterações inflamatórias (Figura 4A). Pulmões do grupo Infecção tiveram processo inflamatório predominantemente mononuclear

linfocitário difuso por todo o tecido, com espessamento de paredes alveolares e algumas regiões com destruição do parênquima pulmonar (Figura 4B).

Nos animais imunizados com a vacina DAPVAX1 foram observadas lesões pulmonares caracterizadas por processo inflamatório mononuclear linfocitário difuso com espessamento de parede de alvéolos (Figura 4C). O grupo DAPVAX2 apresentou pulmões com regiões de infiltrado inflamatório linfomononuclear localizados e presença de macrófagos espumosos não clássicos (Figura 4D).

O tecido pulmonar dos camundongos imunizados apenas com o ADVAX1 apresentou regiões de infiltrado inflamatório localizado (Figura 4E). As lesões observadas no grupo ADVAX2 foram mais acentuadas, com espessamento de parede de alvéolos (setas) e infiltrado inflamatório difuso de linfócitos e macrófagos (Figura 4F).

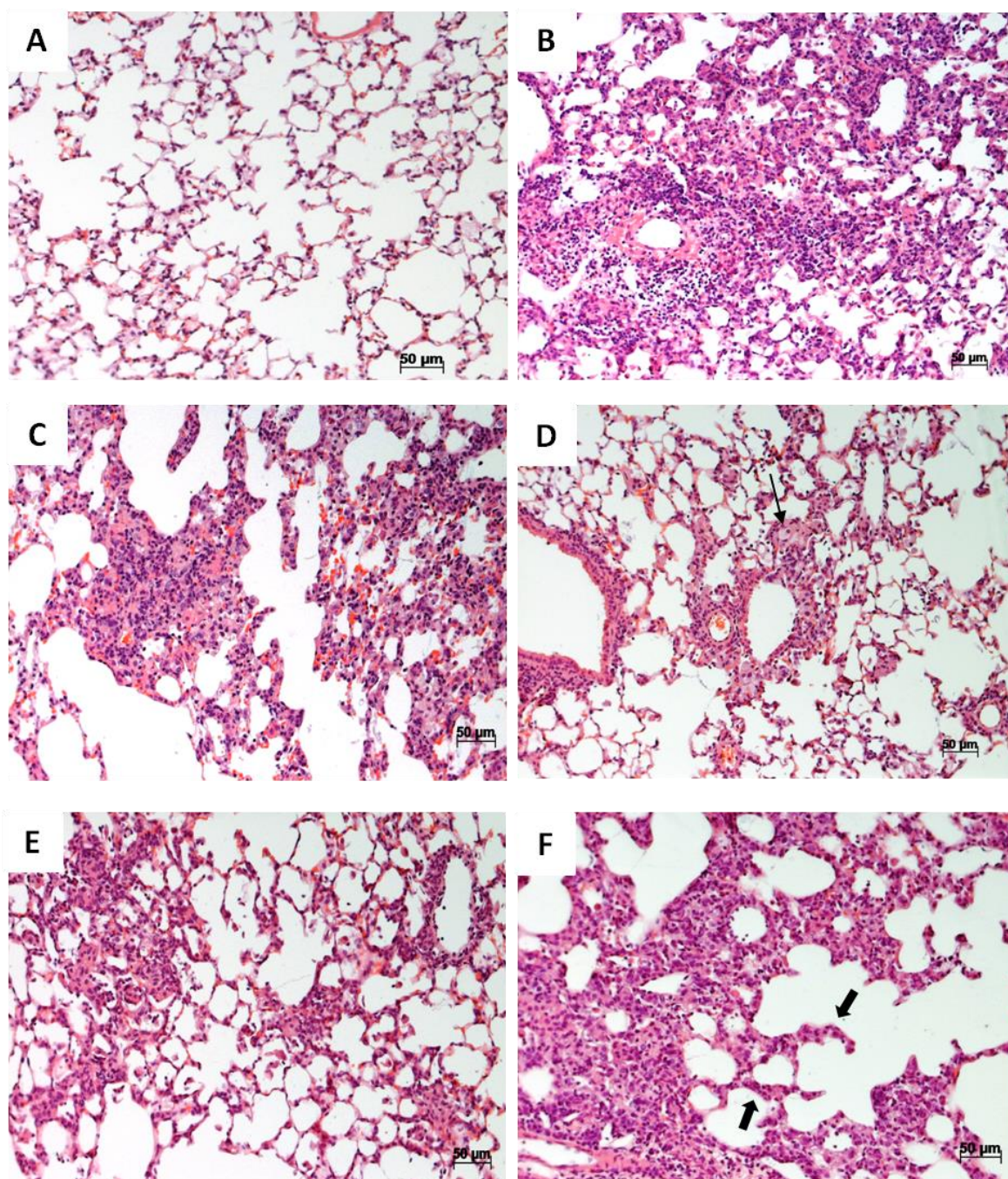


FIGURA 4: Fotomicrografia dos cortes histológicos dos pulmões dos camundongos representativos de cada tratamento, 30 dias após o desafio. (A) padrão pulmonar normal: grupo PBS; (B) espessamento de parede alveolar e infiltrado inflamatório mononuclear linfocitário: grupo Infecção; (C) espessamento de parede alveolar e infiltrado inflamatório mononuclear linfocitário: grupo DAPVAX1; (D) presença de macrófagos espumosos não clássicos: grupo DAPVAX2; (E) presença de infiltrado inflamatório mononuclear linfocitário: grupo ADVAX1; espessamento de parede alveolar e infiltrado inflamatório mononuclear linfocitário: grupo ADVAX2. Aumento de 20X.

De acordo com o escore das lesões o grupo Infecção apresentou maior área de lesão tecidual. E a formulação DAPVAX2 teve menos regiões de processo inflamatório. Entretanto, animais que receberam apenas o adjuvante ADVAX1 foram os que tiveram menor escore de lesões inflamatórias (Figura 5).

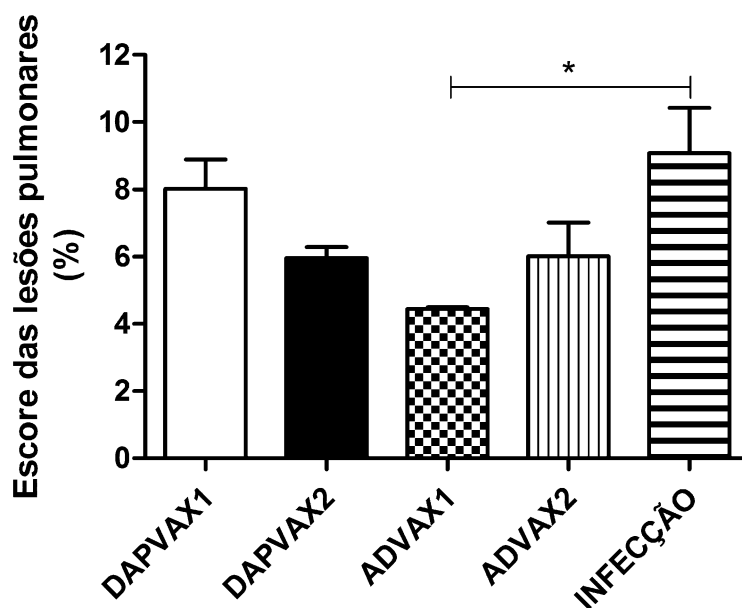


FIGURA 5: Escore das lesões histopatológicas nos cortes de pulmão dos camundongos. *diferença estatística $p < 0,01$. Os tratamentos foram comparados entre si pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni e foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

3.3. Capacidade protetora das vacinas

Trinta dias após o desafio os lóbulos superiores e médios dos pulmões dos animais foram coletados para determinar a carga bacteriana através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após a infecção e, avaliação da capacidade protetora das formulações vacinais.

Nenhuma das formulações testadas foi capaz de proteger os animais de forma significativa. A carga bacilar nos pulmões foi elevada em todos os

grupos vacinados e, DAPVAX2 e ADVAX 2 apresentaram maior número de bacilos do que o grupo Infecção (Figura 6).

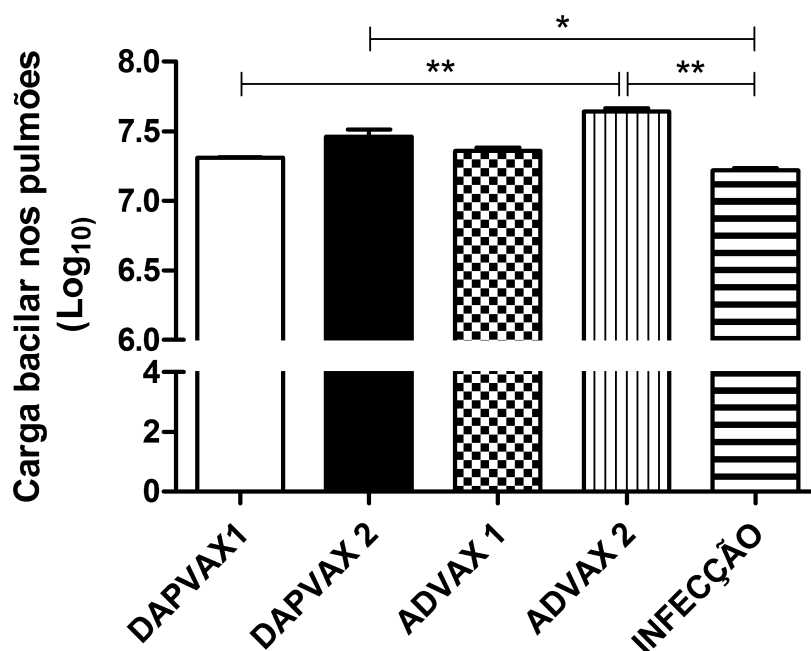


FIGURA 6: Unidades formadoras de colônias (UFC) no pulmão dos camundongos após a infecção com Mtb. *diferença estatística $p < 0,001$; **diferença estatística $p < 0,01$. Os tratamentos foram comparados entre si pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni e foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi analisada a capacidade do adjuvante ADVAX™ em melhorar a resposta imune induzida pela proteína recombinante DAP. Assim duas formulações foram testadas associando a proteína recombinante ao ADVAX1 e ADVAX2, compondo as formulações DAPVAX1 e DAPVAX2. Os camundongos imunizados com as novas vacinas apresentaram elevados índices de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos contra a proteína DAP após a segunda imunização (Figura 2). A formulação DAPVAX2 foi a que melhor induziu anticorpos de ambas as classes, mesmo depois do desafio (Figura 3). A análise histopatológica mostrou que foi também esta formulação umas das que apresentou menor extensão de lesão pulmonar (Figuras 4 e 5). Contudo, a carga bacilar dos pulmões de todos os grupos avaliados foi elevada, não conferindo proteção (Figura 6).

Os dados demonstram que a indução de anticorpos após a infecção pelo Mtb nem sempre está relacionada a uma boa capacidade protetora. A resposta humoral na TB é muito controversa e é de conhecimento geral que existem anticorpos protetores e não protetores na infecção pelo Mtb (TEITELBAUM et al., 1998). Em humanos sabe-se que existe uma heterogeneidade na resposta de anticorpos (STEINGART et al., 2009; YU et al., 2012) havendo evidências de que apenas uma minoria das pessoas infectadas produzem imunoglobulinas protetoras específicas contra antígenos micobacterianos (como a arabinomanana, por exemplo) (NAVOA et al., 2003). Assim, a elevada indução de anticorpos específicos gerada por uma vacinação nem sempre está associada com a capacidade de proteção da vacina. A produção de anticorpos envolve a ativação de células Th1 e Th2, responsáveis por induzir as células B a produzirem imunoglobulinas que auxiliam na eliminação do antígeno, por meio da ativação do sistema complemento. Entretanto, essa mesma via pode favorecer a entrada do antígeno na célula (ABEBE & BJUNE, 2009; MAGLIONE & CHAN, 2009).

TORRADO et al. (2013) verificaram que camundongos que possuíam linfócitos B incapazes de secretar anticorpos foram mais susceptíveis a infecção

por via aérea com Mtb, mesmo quando apresentavam uma população de células B ativa acumulada no pulmão. Os autores associaram essa susceptibilidade à elevada expressão de citocinas (IL-6, IL-10 e GM-CSF) e moléculas produzidas por macrófagos, e concluíram que os linfócitos B podem modular a resposta contra Mtb em um órgão específico, agindo na produção de citocinas e ativação de macrófagos. Esses dados se correlacionam com a elevada indução de anticorpos observada neste estudo que não teve correlação com a proteção, uma vez que as células B ativadas podem produzir citocinas, apresentar antígenos ativando linfócitos T e se ligar ao microorganismo facilitando a fagocitose. Atividades estas que podem desencadear a produção de citocinas e ativação de macrófagos.

Os cortes histológicos dos pulmões dos animais imunizados com as novas formulações contendo o adjuvante ADVAX apresentaram processo inflamatório predominantemente mononuclear, sem formação de granulomas ou necrose, mas com alteração do parênquima pulmonar. Ainda assim, as vacinas não agravaram a patologia gerada pela infecção (Figura 6). Contudo, o resultado da análise histopatológica não se refletiu na carga bacilar nos pulmões, pois as formulações vacinais apresentaram elevado número de bacilos, inclusive maior que o grupo Infecção, como no caso da DAPVAX2 (Figura 7). HU et al. (2013) testaram uma vacina composta pelo ESAT-6 e Ag85 (Pe685a) numa formulação contendo CpG DNA7909. Os autores verificaram que a nova vacina, foi uma forte indutora de anticorpos específicos contra a nova proteína. Todavia, não houve redução na intensidade das lesões pulmonares e tampouco na carga bacilar.

Outro trabalho de 2003 avaliou uma vacina de DNA codificadora da molécula hsp60 do *M. leprae* em modelo de TB murina, observou que 30 dias após a infecção por aerosol o grupo vacinado apresentou patologia pulmonar similar ao grupo apenas infectado (TAYLOR et al., 2003). Ao verificarem a carga bacilar no órgão, os autores constataram que os animais vacinados tiveram maior número de bacilos que o grupo controle infectado. A mesma vacina havia sido testada anteriormente, mas com desafio endovenoso e apresentou resultados positivos (LOWRIE et al., 1999). Porém, no estudo de 2003 com o modelo de desafio que representa melhor a infecção natural os resultados não se repetiram. Estes dados de 2003 e 2013 se assemelham aos dados encontrados neste

estudo e ratificam que mesmo quando uma vacina de subunidade proteica apresenta imunogenicidade e não gera extensas lesões no tecido pulmonar, isso não indica que a mesma terá capacidade protetora.

O adjuvante ADVAX™ tem sido utilizado em diversas vacinas contra doenças infecciosas com resultados promissores. HONDA-OKUBO et al. (2012) observaram que o referido adjuvante melhorou a imunogenicidade e proteção da vacina contra influenza. Os camundongos imunizados com a vacina combinada com ADVAX tiveram aumento de anticorpos neutralizantes e linfócitos B de memória quando comparado aos animais que receberam a vacina sozinha. Em um estudo recente, a associação do ADVAX com antígenos da vacina da hepatite B aumentou a resposta de anticorpos e de células TCD4 e TCD8 específicos em camundongos (SAADE et al., 2013). Outro trabalho demonstrou que a formulação JE-ADVAX, uma nova candidata a vacina contra o vírus da encefalite japonesa, foi altamente imunogênica e conferiu proteção eficiente em camundongos pela indução de células B de memória. Contudo no modelo utilizado neste estudo os resultados de proteção não foram positivos, apesar da forte indução de anticorpos gerada principalmente pela formulação DAPVAX2.

Como outros relatos da literatura, a indução de imunoglobulinas por vacinação não mostrou correlação com a proteção no modelo estudado. Sabe-se que em infecções virais a produção de anticorpos neutralizantes é muito importante para a eliminação dos antígenos. No caso da TB, o papel efetivo das células B e dos anticorpos na geração de resposta imune protetora ainda é controverso. Logo, após a vacinação com as formulações DAPVAX provavelmente não foi induzida uma resposta de longa vida, que poderia ser reestimulada após o desafio. Assim, outros métodos devem ser estudados para a validação de moléculas adjuvantes bem como de antígenos que podem compor vacinas de subunidade proteica contra a TB.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo foi avaliada a capacidade do adjuvante ADVAX em melhorar a resposta imunogênica induzida pela proteína recombinante DAP. A associação de duas formulações de ADVAX com a proteína gerou uma resposta robusta de anticorpos específicos das classes IgG1 e IgG2a. Após o desafio, apesar de não ter havido agravo na patologia pulmonar gerada pela infecção, as novas vacinas não foram capazes de proteger os camundongos que apresentaram elevada carga bacilar.

REFERÊNCIAS

- 1 ABEBE, F.; BJUNE, G. The protective role of antibody response during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 157, p. 235-243, 2009.
- 2 ALLISON, A. C.; BYARS, N. E. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. **Molecular Immunology**, v. 28, n. 3, p. 279–284, 1991.
- 3 DE, G. E.; D'ORO, U.; WACK, A. Immunology of TLR-independent vaccine adjuvants. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, p. 339–345, 2009.
- 4 EDELMAN, R. The development and use of vaccine adjuvants. **Molecular Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 56–67, 2002.
- 5 FREUND, J.; CASALS, J.; HOSMER, E. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and parafin oil. **Proc Soc Experimental Biology Medicine**, v. 37, p. 509–513, 1937.
- 6 GOTZE, O.; MULLER-EBERHARD, H. J. The C3-activator system: an alternate pathway of complement activation. **Journal of Experimental Medicine**, v.134, p. 90–108, 1971.
- 7 GUPTA, R. K.; RELYVELD, E. H.; LINDBLAD, E. B.; BIZZINI, B.; BEN-EFRAIM, S.; GUPTA, C. K. Adjuvants: a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**, v. 11, n. 3, p. 293–306, 1993.
- 8 HONDA-OKUBO, Y.; SAADE, F.; PETROVSKY, N. Advax™, a polysaccharide adjuvant derived from delta inulin, provides improved influenza vaccine protection through broad-based enhancement of adaptive immune responses. **Vaccine**, v.30, p. 5373-5381, 2012.
- 9 HU, S.; CHEN, H.; MA, J.; CHEN, Q.; DENG, H.; GONG, F.; HUANG, H.; SHI, C. CpG7909 adjuvant enhanced immunogenicity efficacy in mice immunized with ESAT6-Ag85A fusion protein, but does not confer significant protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 1203-1211, 2013.
- 10 LARENA, M.; PROW, N. A.; HALL, R. A.; PETROVSKY, N.; LOBIGS, M. JE-ADVAX vaccine protection against Japanese Encephalitis Virus mediated by memory B cells in the absence of CD8⁺ T cells and pre-exposure neutralizing antibody. **Journal of Virology**, v. 87, n. 8, p. 4395, DOI: 10.1128/JVI.03144-12, 2013.
- 11 LOWRIE, D. B.; TASCON, R. E.; BONATO, V. L.; LIMA, V. M.; FACCIOLI, L. H.; STAVROPOULOS, E.; COLSTON, M. J.; HEWINSON, R. G.; MOELLING,

K.; SILVA, C. L. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. **Nature**, v. 400, p. 269–271, 1999.

12 MAGLIONE, P. J.; CHAN, J. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Immunology**, v. 39, p. 676–686, 2009.

13 NAVOA, J. A.; LAAL, S.; PIROFSKI, L. A.; MCLEAN, G. R.; DAI, Z.; ROBBINS, J. B.; SCHNEERSON, R.; CASADEVALL, A.; GLATMAN-FREEDMAN, A. Specificity and diversity of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, p.88–94, 2003.

14 PETROVSKY, N. Novel human polysaccharide adjuvants with dual Th1 and Th2 potentiating activity. **Vaccine**, v.12, n. 24(Supl.2): S2-26-29, 2006.

15 SAADE, F.; HONDA-OKUBO, Y.; TREC, S.; PETROVSKY, N. A novel hepatitis B vaccine containing Advax™, a polysaccharide adjuvant derived from delta inulin, induces robust humoral and cellular immunity with minimal reactogenicity in preclinical testing. **Vaccine**, v.31, p. 1999-2007, 2013.

16 SILVA, D.G.; COOPER, P. D.; PETROVSKY, N. Inulin-derived adjuvants efficiently promote both Th1 and Th2 immune responses. **Immunology and Cell Biology**, v. 82, p. 611-616, 2004.

17 STEINGART, K. R.; DENDUKURI, N.; HENRY, M.; SCHILLER, I.; NAHID, P.; HOPEWELL, P. C.; RAMSAY, A.; PAI, M.; LAAL, S. Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 16, p. 260–276, 2009.

18 TAYLOR, J. L.; TURNER, O. C.; BASARABA, R. J.; BELISLE, J. T.; HUYGEN, K.; ORME, I. M. Pulmonary necrosis resulting from DNA vaccination against tuberculosis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 2192-2198, 2003.

19 TEITELBAUM, R.; GLATMAN-FREEDMAN, A.; CHEN, B.; ROBBINS, J.; UNANUE, E. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 95, p. 15688–15693, 1998.

20 TORRADO, E.; FOUNTAIN, J. J.; ROBINSON, R. T.; MARTINO, C. A.; PEARL, J. E.; RANGEL-MORENO, J.; TIGHE, M.; DUNN, R.; COOPER, A. M. Differential and site specific impact of B Cells in the protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis* in the mouse. **Plos One** v. 8, n. 4: e61681, 2013.

21 TRITTO, E.; MOSCA, F.; DE, G. E. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 27, p. 3331–3334, 2009.

22 YU, X.; PRADOS-ROSALES, R.; JENNY-AVITAL, E. R.; SOSA, K.; CASADEVALL, A.; ACHKAR, J. M. Comparative evaluation of profiles of

antibodies to mycobacterial capsular polysaccharides in tuberculosis patients and controls stratified by HIV status. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 19, p. 198–208, 2012.

CAPÍTULO 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitos avanços foram alcançados na última década pela comunidade científica envolvida em estudos de controle da tuberculose. Novos alvos de drogas e vacinas têm sido avaliados com resultados promissores, e atualmente, 12 vacinas já estão em fase clínica de testes. Contudo, a vacina BCG ainda é a mais segura para ser utilizada em recém-nascidos contra as formas mais graves da tuberculose, sendo amplamente utilizada em todo o mundo.

Em 2013, o Brasil alcançou a meta estabelecida pela OMS que estava prevista para o ano de 2015, com a diminuição pela metade na incidência da TB e no número de mortes causadas pela doença. Entretanto, muitas medidas ainda precisam ser tomadas para que consigamos chegar à meta de erradicar a doença em 2050. Assim, estudos que visem o desenvolvimento de novas tecnologias para o combate da tuberculose revestem-se de importância merecendo especial atenção das autoridades dos países, instituições de ensino bem como das empresas privadas.

Em nosso grupo de pesquisa muitos estudos já foram realizados com diferentes formulações vacinais contendo outras proteínas recombinantes do Mtb associadas a diferentes adjuvantes. Alguns dos adjuvantes já utilizados foram o CpG DNA e o lipossoma que apresentaram resultados promissores na proteção contra a TB.

No presente estudo as formulações vacinais testadas apresentaram-se promissores nas análises iniciais com geração de resposta imune específica e melhoria da resposta induzida pela vacina BCG. No, entanto esse resultado não se refletiu na proteção dos animais, o que leva a análise de alguns fatores; 1: por não haver informações na literatura sobre a proteína e o adjuvante Cn-AMP1 no modelo utilizado foi realizado um esquema de hiperimunização para analisar a capacidade de indução de anticorpos pela nova formulação; 2: para a formulação DAPVAX este esquema foi mudado para 21 dias de intervalo e apenas duas imunizações, pois há na literatura comprovação da indução de anticorpos pela associação do ADVAX em vacinas contra infecções virais; 3: foi utilizada uma elevada dose de infecção por via endovenosa, o que gera uma resposta

inflamatória sistêmica. Logo, a proteína e os adjuvantes utilizados precisam ser mais bem caracterizados como componentes de vacina de subunidade proteica levando-se em consideração as vias de inoculação e infecção, o ciclo e a dose de imunização, além da combinação de outros antígenos do Mtb com os adjuvantes.

ANEXO 1- Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 04 de março de 2013.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA/ENSINO PROTOCOLADO NA CEUA SOB O N°. 079/12

I. IDENTIFICAÇÃO:

1. **Título do projeto:** *Análise imunogênica da proteína recombinante aspartil aminopeptidase (Rv0800) de Mycobacterium tuberculosis*
2. **Pesquisador Responsável:** Ana Paula Junqueira Kipnis
3. **Unidade/Órgão:** Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/IPTSP-UFG
4. **Pesquisadores Participantes:** André Kipnis; Duanne Alves da Silva; André França Corrêa; Monalisa Martins Trentini.
5. **Unidade onde será realizado:** Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/IPTSP-UFG
6. **Data de apresentação do protocolo à CEUA:** 04/12/2012
7. **Data do Relato:** 14/01/13
8. **Data de Primeiro Atendimento das Pendências:** 01/03/2013

II - Parecer do CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08.

III - Data da reunião: 04/03/13


Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFG
Profª. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora de Comissão de Ética no Uso de Animais
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação / UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
Email: ceua.ufg@gmail.com